

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-321199

(P2001-321199A)

(43)公開日 平成13年11月20日(2001. 11. 20)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームト*(参考)
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A
C 0 7 K 14/47		C 0 7 K 14/47	
C 1 2 N 15/09	Z N A	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15		33/50	Z
33/50		33/53	M

審査請求 未請求 請求項の数47 O L (全 21 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2001-103067(P2001-103067)	(71)出願人	593108772 ヘルス リサーチ インコーポレイテッド Health Research, In c. アメリカ合衆国、ニューヨーク州 14263、 バッファロー、エルム アンド カールト ン ストリーツ (番地なし)、ロズウェル パーク キャンサー インスティテュー ト ディヴィジョン内
(22)出願日	平成13年4月2日(2001. 4. 2)	(74)代理人	100059959 弁理士 中村 稔 (外9名)
(31)優先権主張番号	0 9 / 5 3 9 9 4 5		
(32)優先日	平成12年3月31日(2000. 3. 31)		
(33)優先権主張国	米国 (U S)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 DNA結合タンパク質のDNA結合活性の定量法

(57)【要約】

【課題】 生物学的試料中のDNA結合タンパク質を定量する方法の提供。

【解決手段】 放射性同位元素を使用することなく、電気泳動移動度シフトアッセイより (EMSA) も高い感度で、生物学的試料中のDNAと相互作用するDNA結合タンパク質を定量する方法であって、DNA結合タンパク質について試験される液体を得るために試料を処理し、DNA結合タンパク質を含有する液体を、DNA結合タンパク質が特異的に結合することができる結合部位を含むDNAと共にインキュベーションし、DNA結合タンパク質をDNAに特異的に結合させ、結合したDNA結合タンパク質を伴うDNAを、液体中のその他のDNA及びタンパク質から分離し、及び分離されたDNA結合タンパク質の量に比例する第一の数値結果を生じる試験を用いて分離されたDNA結合タンパク質を検出することを含む、前記方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 放射性同位元素を使用することなく、かつ電気泳動移動度シフトアッセイ(EMSA)よりも高い感度で、生物学的試料中のDNAと相互作用するDNA結合タンパク質を定量する方法であって、該方法が下記の工程を含むことを特徴する方法：

- a) DNA結合タンパク質について試験される液体を得るために試料を処理する工程；
- b) DNA結合タンパク質を含有する液体を、DNA結合タンパク質が特異的に結合することができる結合部位を含むDNAと共にインキュベーションし、その結果DNA結合タンパク質をDNAに特異的に結合させる工程；
- c) 結合したDNA結合タンパク質を伴うDNAを、液体中のその他のDNA及びタンパク質から分離する工程；及び
- d) 分離されたDNA結合タンパク質の量に比例する第一の数値結果を生じる試験を用い、放射性同位元素を使用することなく、かつEMSAよりも高い感度で、分離されたDNA結合タンパク質を検出する工程であって、該試験が、結合されたDNAと共に分離されたDNA結合タンパク質の免疫学的定量法、及びDNA結合タンパク質と共に分離されたDNAのPCR増幅とそれに続くPCR増幅されたDNAの定量からなる群より選択される工程。

【請求項2】 分離されたDNA結合タンパク質の特異的免疫反応性部位と共通の特異的免疫活性部位を有する、総試料中のタンパク質が、総タンパク質の量に比例する第二の数値結果を生じる試験を用いて検出され、かつ該総タンパク質中の結合及び未結合のタンパク質の相対割合を反映している指標を得るために、第一の数値結果を第二の数値結果と比較することを特徴とする、請求項1記載の方法。

【請求項3】 DNA結合タンパク質が特異的に結合する結合部位を有するDNAを物質で処理し、処理されたDNAが結合配列と干渉することなく液体中の他のDNAから分離されることを可能にする部位を提供し、DNA結合タンパク質を含有する液体を、該処理されたDNAと共にインキュベーションし、その結果DNA結合タンパク質がDNAに特異的に結合し、かつ結合されたDNA結合タンパク質を伴う処理されたDNAが、提供された分離部位を用いて液体中の他のDNAから分離されることを特徴とする、請求項1記載の方法。

【請求項4】 下記の工程を含む、DNA結合タンパク質のDNAとの相互作用を検出することを特徴とする、請求項1記載の方法：

- a) 生物学的試料中のDNA結合タンパク質を固相マトリックスに固定する工程；
- b) DNA結合タンパク質を、このDNA結合タンパク質が特異的に結合することができる部位を含むDNA鋳型と共にインキュベーションする工程
- c) 該DNA結合タンパク質に非特異的なDNA二重鎖を含むことにより、非特異的結合を減少する工程；

- d) 非特異的DNAを制限消化により除去する工程；
- e) ポリメラーゼ連鎖反応により、特異的に結合されたDNAを増幅する工程；及び
- f) 増幅されたDNAを定量する工程。

【請求項5】 前記DNAがビオチン化され、かつ基体に結合されたストレプトアビジンとの反応により該液体から除去されることを特徴とする、請求項3記載の方法。

【請求項6】 前記結合タンパク質が、該DNAの除去後にDNAから解放され、かつSDS-ゲル分画とそれに続くイムノブロットングによる定量が行われることを特徴とする、請求項5記載の方法。

【請求項7】 前記結合タンパク質が、p53抗体を用いてイムノプロットされるp53であることを特徴とする、請求項6記載の方法。

【請求項8】 前記DNAが、液体中の全DNAに制限部位を提供することにより処理され、この制限部位は、結合タンパク質の結合により、制限部位に特異的な制限酵素による破壊から保護することができ、かつ結合タンパク質に結合したDNAは、液体中のDNAを制限酵素に曝露し、その結果未結合DNAを破壊することにより、液体中の他のDNAから分離されることを特徴とする、請求項3記載の方法。

【請求項9】 前記結合したDNAを、液体中の他のDNAから分離した後、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅に供し、かつ増幅されたDNAを定量することを特徴とする、請求項8記載の方法。

【請求項10】 前記増幅されたDNAが、DNA染色を伴うアガロースゲル電気泳動、酵素結合オリゴヌクレオチド吸着アッセイ(ELISA)、及び、蛍光分光サーモサイクラーによるプライマーとしてビーコンオリゴヌクレオチドを用いるPCRからなる群より選択される検出法により定量されることを特徴とする、請求項9記載の方法。

【請求項11】 前記指標が患者の治療コースを決定するために使用されることを特徴とする、請求項2記載の方法。

【請求項12】 前記指標が患者の予後を決定するために使用されることを特徴とする、請求項2記載の方法。

【請求項13】 分離されたDNA結合タンパク質の特異的免疫反応性部位と共通の特異的免疫反応性部位を有する、前記試料中の総タンパク質を、総タンパク質の量に比例する第二の数値結果を生じる試験を用いて検出し、かつ第一の数値化結果を第二の数値結果と比較し、該総タンパク質と比較される分離された結合したDNA結合タンパク質の量を反映する指標を得ることを特徴とする、請求項3、5～10のいずれか1項記載の方法。

【請求項14】 前記試料中の総タンパク質が、総タンパク質を含有する液体の試料を、SDS-ゲル分画に供し、その後さらに、結合タンパク質を測定するためのイムノブロットングと平行して、免疫反応性部位と反応性の同じ抗体を用いるイムノブロットングによる定量を行

い、かつ該総タンパク質の量を結合タンパク質の量と比較し、前記指標を得ることによる定量に供することを特徴とする、請求項2記載の方法。

【請求項15】 前記指標を用いて、療法の活性と疾患の治療にとって好ましいDNA結合タンパク質の活性を変更する物質とをスクリーニングすることを特徴とする、請求項2記載の方法。

【請求項16】 前記生物学的試料が細胞溶解液を含むことを特徴とする、請求項1記載の方法。

【請求項17】 下記の工程を含むことを特徴とする、請求項1記載の生物学的試料中のDNA結合タンパク質のDNA結合を定量し、かつこれを試料中の、DNA結合タンパク質と共通の特異的免疫反応性部位を少なくとも1個有する総タンパク質と比較する方法：

- a) DNA結合タンパク質を含む総タンパク質を含有する液体を得るために試料を処理する工程；
- b) DNA結合タンパク質が特異的に結合することができる部位を含む、DNA鋳型を作出する工程；
- c) DNA結合タンパク質を含有する液体を、DNA鋳型と共にインキュベーションし、その結果DNA結合タンパク質が、該DNAに特異的に結合し、複合体を形成する工程；
- d) 結合されたDNA結合タンパク質を伴うDNA鋳型を液体から取り除く工程；
- e) DNA結合タンパク質及び該総タンパク質を定量する工程；及び
- f) 結合タンパク質を総タンパク質と比較し、該総タンパク質中の結合及び未結合のタンパク質の相対割合を反映している指標を得る工程。

【請求項18】 前記指標を用いて、療法の活性と疾患の治療にとって好ましいDNA結合タンパク質の活性を変更する物質とをスクリーニングすることを特徴とする、請求項17記載の方法。

【請求項19】 前記疾患が癌であることを特徴とする、請求項18記載の方法。

【請求項20】 下記工程を含むことを特徴とする、生物学的試料中の活性DNA結合タンパク質を検出する、請求項17記載の方法：活性DNA結合タンパク質との特異的結合部位を有する二重鎖DNAをビオチン化し、DNA鋳型を作出する工程、ストレプトアビジンを用いて、該液体から、結合されたDNA結合タンパク質を伴うDNA鋳型を取り除く工程、及び同じ抗体を用いるイムノブロッティングを並行して用いる、DNA結合タンパク質を総タンパク質に対して定量する工程。

【請求項21】 配列特異的DNA結合タンパク質の同定に使用されることを特徴とする、請求項20記載の方法。

【請求項22】 DNA-タンパク質相互作用を標的とする化合物、タンパク質及び試薬のスクリーニングのために使用されることを特徴とする、請求項20記載の方法。

【請求項23】 様々な分子量を有する複数のDNA結合

タンパク質を同時に検出するために使用されることを特徴とする、請求項20記載の方法。

【請求項24】 前記ビオチン化されたDNAが、少なくとも部分的に配列以外の特徴を基にした独自の構造を有することを特徴とする、請求項20記載の方法。

【請求項25】 前記独自の構造がホリデイ構造であることを特徴とする、請求項24記載の方法。

【請求項26】 前記独自の構造がDNAミスマッチ構造であることを特徴とする、請求項24記載の方法。

【請求項27】 前記DNA-タンパク質複合体が更に、ゲルで分画されたポリペプチドの微量配列決定により特徴付けられることを特徴とする、請求項20記載の方法。

【請求項28】 前記DNA-タンパク質複合体が更に表面増強レーザー脱離/イオン化質量分析により特徴付けられることを特徴とする、請求項20記載の方法。

【請求項29】 前記試料が細胞溶解液であり、かつ前記分離された結合したDNAがPCRにより増幅され、ここでDNA結合タンパク質に特異的な抗体がDNA-タンパク質複合体を該試料から固相マトリックスへ分離するために使用されることを特徴とする、請求項17記載の方法。

【請求項30】 前記固相マトリックスがマイクロタイタープレートであることを特徴とする、請求項29記載の方法。

【請求項31】 前記結合タンパク質に非特異的なDNAが該試料に添加され、該DNA結合タンパク質以外のタンパク質のDNA鋳型への非特異的結合を減少することを特徴とする、請求項29記載の方法。

【請求項32】 前記結合タンパク質に非特異的なDNAが、結合タンパク質のためのDNA結合部位が突然変異されている以外は、DNA鋳型と同一の非特異的DNA二重鎖であることを特徴とする、請求項31記載の方法。

【請求項33】 前記DNA鋳型が、増幅用の対応するPCRプライマーと相補的である結合部位に隣接する配列を有する二重鎖DNAを含むことを特徴とする、請求項29記載の方法。

【請求項34】 前記DNA鋳型が、結合部位へ結合されたタンパク質により制限エンドヌクレアーゼによる消化から保護され得る結合部位のスペーサー領域及びフランキンク領域に組み入れられた制限エンドヌクレアーゼ部位を有する二重鎖DNAを含むと同時に、未結合DNAが制限エンドヌクレアーゼにより消化を受けることを特徴とする、請求項29記載の方法。

【請求項35】 総タンパク質が、下記の工程を含む方法により検出される総p53タンパク質であることを特徴とする、請求項2記載の方法：

- a) 生物学的試料中の総p53タンパク質を、固相マトリックス上に固定する工程；
- b) p53タンパク質及びビオチンの両方に結合する二官能性融合分子を、固定されたp53タンパク質に結合する工程；

- c) p53タンパク質結合に特異的でないビオチン化されたDNAを、結合された融合タンパク質に結合する工程；
- d) 結合されたビオチン化されたDNAを、ポリメラーゼ連鎖反応により増幅する工程；及び
- e) 増幅されたDNAを定量する工程。

【請求項36】 捕獲剤がストレプトアビジンであることを特徴とする、請求項35記載の方法。

【請求項37】 前記結合タンパク質がp53であり、かつ捕獲剤がSV40 Tagであり、かつ第一の数値結果が試料中のp53結合タンパク質の量に比例していることを特徴とする、請求項35記載の方法。

【請求項38】 野生型p53及びビオチンに特異的である、SV40 Tag及びストレプトアビジンの二官能性融合タンパク質を使用することを特徴とする、請求項37記載の方法。

【請求項39】 増幅用の対応するPCRプライマーと相補的であるDNA配列を有するビオチン化されたDNA二重鎖を使用することを特徴とする、請求項35記載の方法。

【請求項40】 分離されたDNA p53結合タンパク質の特異的免疫反応性部位と共通の特異的免疫反応性部位を有する、前記試料中の総p53型タンパク質が、総p53型タンパク質の量に比例する第二の数値結果を生じる試験を用いて検出され、かつ第一の数値結果と第二の数値結果を比較し、該総タンパク質中の結合及び未結合p53型タンパク質の相対割合を反映している指標を得ることを特徴とする、請求項37記載の方法。

【請求項41】 前記総タンパク質が、下記を含む方法で検出されることを特徴とする、総エストロゲン受容体タンパク質である、請求項2記載の方法：

- a) 生物学的試料中の前記エストロゲン受容体タンパク質を固相マトリックス上に固定する工程；
- b) ビオチン化されたリガンドエストラジオールを固定されたエストロゲン受容体に結合する工程；
- c) ストレプトアビジンを、結合されたビオチン化されたリガンドエストラジオールと結合する工程；
- d) エストロゲン受容体結合に特異的でないビオチン化されたDNAを、結合されたストレプトアビジンに結合する工程；
- e) 結合されビオチン化されたDNAをPCRにより増幅する工程；及び
- f) 増幅されたDNAを定量する工程。

【請求項42】 前記ビオチン化されたDNAが、増幅用の対応するPCRプライマーと相補的であるDNA配列を有するビオチン化されたDNA二重鎖であることを特徴とする、請求項41記載の方法。

【請求項43】 定量され増幅されたDNAが、結合及び未結合のエストロゲン受容体タンパク質の相対割合を反映している指標を算出するための第二の数値結果として使用されることを特徴とする、請求項41記載の方法。

【請求項44】 前記試料が細胞溶解液を含むことを特

徴とする、請求項2記載の方法。

【請求項45】 前記試料が腫瘍細胞溶解液を含むことを特徴とする、請求項2記載の方法。

【請求項46】 前記DNA結合タンパク質が核タンパク質であることを特徴とする、請求項2記載の方法。

【請求項47】 様々な分子量を有する多くの異なるDNA結合タンパク質が、異なるDNA結合タンパク質が特異的に結合することができる結合配列を含む多くのDNAを用いて同時に定量され、ここで該特異的結合配列を含むDNAが、結合配列に干渉することなく、液体中の他のDNAから、処理されたDNAを分離することを可能にするような部位を提供する物質により全て処理されることを特徴とする、請求項1、2又は17記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、DNA結合タンパク質の定量に関し、特にDNA結合タンパク質のDNA結合の定量に関する。本発明は特に、臨床及び臨床検査(laboratory)の両方の場面において使用するためのDNA結合タンパク質のDNA結合活性の定量に応用できる方法及びキットに関する。このような定量は、多くの疾患、例えば癌研究の指標及び信頼できる予後診断の指標の両方に使用することができる。

【0002】

【従来の技術】集団としてのDNA結合タンパク質、すなわちそれらの活性型が特異的にDNAに結合するタンパク質は、必ずしもではないが、通常、細胞の核物質中で、DNAと特異的に直接相互作用することで機能する。これらは、遺伝子発現を起動する転写因子、特化された機能を付与するステロイドホルモン受容体、及びゲノムの完全性を維持するDNA修復タンパク質として、正常細胞の活性において中心的役割を果たしている。DNA結合タンパク質は、水素結合、イオン結合、及び疎水性相互作用のような非共有相互作用を介してDNAに結合している。DNAとDNA結合タンパク質の間の相互作用は弱いにも関わらず、DNAと結合タンパク質の巨大な境界面上の複数の接触が関与するために、これは生物学において公知の最も特異的な非共有相互作用のひとつである。DNA又はタンパク質のいずれかのわずかな変化は、この相互作用を劇的に破壊し；その結果、DNA結合タンパク質の微妙な変化が細胞活性の劇的な変化を生じることがある。多くの癌遺伝子及び腫瘍抑制遺伝子が、DNA結合タンパク質として同定されており、これはmyc、jun/fos、myb、erbA、NFκB及びp53を含んでいる。別のDNA結合タンパク質は、例えばp53及びエストロゲン受容体(ER)を含む。それらの腫瘍発生における役割を解明する集中的な研究が行われているにも関わらず、腫瘍の診断及び予後判定に関する臨床適用におけるDNA結合タンパク質の価値は、未だ完全には認められていない。

【0003】p53は、ヒト癌において検出された最も頻

繁に変更されたDNA結合タンパク質のひとつであり、これについては、例えば背景技術として本願明細書に参照として組入れられている、Harris, C.C.及びHolstein, M.の論文「p53腫瘍抑制遺伝子の臨床的意義」、New England Journal of Medicine, 329:1318-1327 (1993)を参照のこと。野生型p53は、細胞周期のチェックポイントを媒介し、損傷を受けたDNAの修復をもたらす、又修復不可能なDNA損傷を伴う細胞におけるアポトーシスを誘導する。様々な化学療法薬に対する腫瘍反応の共通のメカニズムは、p53が媒介したアポトーシスに起因している。しかし臨床における信頼できる予後診断マーカーとしてのp53突然変異の使用は、望まれるほどに有効ではない。

【0004】臨床において使用される現在の方法は、癌集団におけるp53の急性の状態を反映するのに十分な感度及び特異性がない。免疫組織化学(IHC)、1本鎖コンホメーション多型(SSCP)、及び酵母機能アッセイが、p53の状態の評価に使用される現在の方法である。IHCは、タンパク質の抗原性のみを検出し、検出されたタンパク質の機能性は必然的に反映していない。DNA配列決定と組合せたSSCPは、p53突然変異の位置を示すことは可能であるが、サイレント突然変異と機能的突然変異を区別するためには追加情報が必要である。酵母ベースの機能アッセイは、機能レベルでp53突然変異をより正確に検出した；しかし、p53は突然変異を伴わないと不活化されるので、この用途は狭い。p53突然変異に加え、p53の不活化は、ヒトパピローマウイルスのE6タンパク質のようなウイルス性癌遺伝子によって生じ；ATM及びDNA依存性プロテインキナーゼのように、p53を誘導及び活性化するような上流経路を欠損し；かつ、分解のためにp53のユビキチン化を媒介するmdm-2を過剰発現する。従って、p53遺伝子型のみではなく、p53経路の完全性もベースにした機能アッセイは、診断及び治療法設計においてより信頼できるものである。

【0005】p53のトランス活性化の分子的基础は、その下流遺伝子の調節領域において認められたp53コンセンサスDNA配列への結合である。腫瘍細胞におけるp53状態の指標として下流遺伝子(例えばp21)の発現を検出することが可能であるように見える。しかしp21の発現は、p53とは無関係の経路によっても調節される。更にp21発現は、特定の症例においてはより良い予後に関連しているが、別の症例において予後不良に関連している。配列-特異的DNA結合はp53活性にとって必須であると考えられるので、p53タンパク質は細胞に不活性状態でも存在することができることから、これは該タンパク質の稀な存在以外を機能的に評価する手段を提供する。p53タンパク質のDNA結合活性を測定することによって、遺伝子突然変異により、更には翻訳後修飾により生じるp53の異常を検出することが可能である。

【0006】最も一般的なDNA結合の検出に使用される

方法は、電気泳動移動度シフトアッセイ(EMSA)であり、これはDNA結合タンパク質の分析のために広範に使用されており、これについては例えば、本願明細書に背景技術として組入れられている、Garner, M.M.及びRevzin, A.、「特異的DNA領域へのタンパク質結合の定量に関するゲル電気泳動法：大腸菌ラクトースオペロン調節システムの構成要素への適用」、Nucleic Acids Research, 9:3047-3060 (1981)を参照のこと。このアッセイの臨床での用途を制限するような欠点を以下に挙げる：(1)結果の解釈及び定量が困難であること、(2)制限された反応容量のために感度不良であること、及び(3)放射性物質の取扱いの煩雑さである。感度を増強する目的で、タンパク質/DNA複合体を、対応する抗体との免疫沈降により濃縮するMcKayアッセイが開発されており、これについては例えば本願明細書に背景技術として組入れられている、McKay, R.D.、「シミアンウイルス40のT抗原関連タンパク質のDNAへの結合」、Journal of Molecular Biology, 145:471-488 (1981)を参照のこと。しかしDNA結合タンパク質の定量は、イムノブロットング又はELISAにより個別のアリコートにおいて行わなければならない、これにより目的の定量が制限される。EMSAの派生法として、McKayアッセイは放射性同位元素を使用しているが、このことがその臨床における一般的実践を大きく制限している。癌の予後診断のためのp53 DNA結合の分析は、より感度があり、定量可能でありかつ臨床及び臨床検査の両方において実行可能であるような別のDNA結合アッセイを求めている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】従って本発明の目的は、DNA結合タンパク質のDNA結合活性を量的に決定する方法を提供することである。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明において、生物学的試料中のDNA結合タンパク質の定量法が提供されている。この方法は、放射性同位元素が存在しない状況で、かつ前述の通常使用される電気泳動移動度シフトアッセイ(EMSA)法よりもより大きい感度で使用する事ができる。特に本方法は下記の工程を含む：

- a) DNA結合タンパク質について試験する液体を得るために、試料を処理する工程；
- b) DNA結合タンパク質を含有する液体を、DNA結合タンパク質が特異的に結合することができる結合配列を有しているDNAと共にインキュベーションし、その結果DNA結合タンパク質がDNAに特異的に結合する工程、
- c) 結合したDNA結合タンパク質を伴うDNAを、液体中の他のDNA及びタンパク質から分離する工程、及び

【0009】d) 分離されたDNA結合タンパク質の量に比例する第一の数値結果を生じる試験を用い、放射性同位元素を使用せず、かつEMSAよりも感度が良い、分離されたDNA結合タンパク質を検出する工程であり、該試験

が、結合したDNAと共に分離されたDNA結合タンパク質の免疫学的定量及びDNA結合タンパク質と共に分離されたDNAのPCR増幅と、それに続くPCR増幅したDNAの定量からなる群より選択される工程。この方法は更に、試料中の、分離されたDNA結合タンパク質の特異的免疫反応性部位と共通の特異的免疫反応性部位を有する総タンパク質が、該総タンパク質の量に比例する第二の数値結果を生じる試験を用いて検出される実施態様を含んでいる。その後第一の数値結果を、第二の数値結果と比較し、該総タンパク質中の結合及び未結合のタンパク質の相対的割合を反映している指標を得ることができる。

【0010】この方法の実践において、付着した結合タンパク質を伴う所望のDNAは、いくつかの方法で液体中のその他のDNA及びタンパク質から分離することができる。

【0011】DNA結合タンパク質が特異的に結合することができる結合配列を含むDNAを、結合配列に干渉することなく、処理されたDNAが液体中の他のDNAから分離されることを可能にする部位を提供する物質で処理することができ、その後、DNA結合タンパク質を含有する液体を、処理されたDNAと共にインキュベーションし、その結果DNA結合タンパク質がDNAに特異的に結合する。次に結合したDNA結合タンパク質を伴う処理されたDNAは、提供された分離部位を用いて、液体中のその他のDNAから分離することができる。このような方法の例として、DNAをビオチン化し、かつ例えば磁気ビーズのような基体に固定された例えばストレプトアビジンのような捕獲剤(captive agent)との反応により取り除くことができる。

【0012】別の例において、DNA結合タンパク質と反応する前に、DNAは液体中の全てのDNAに制限部位を提供するように処理することができ、この制限部位は、結合タンパク質との結合によりその制限部位に特異的な制限酵素による破壊から保護され得る。次に液体中のDNAを制限酵素に曝露し、その結果結合していないDNAを破壊することによって、液体中の他のDNAから結合タンパク質に結合したDNAを分離することができる。

【0013】液体中のその他のDNA及びタンパク質から分離した後に、DNA結合タンパク質の量をいくつかの方法で定量することができる。第一の一般的定量法においては、結合タンパク質は、例えばDNAの除去後DNAから解放されること、及びSDS-ゲル分画と、それに続く特定のDNA結合タンパク質に特異的な抗体を使用するイムノブロットングによる定量を行うことにより、直接定量される。例えば、結合タンパク質がp53であるならば、p53抗体を用いてイムノブロットすることができる。

【0014】第二の一般的方法において、DNA結合タンパク質は、例えば結合したDNA結合タンパク質と共に取り除かれたDNAにポリマーゼ連鎖反応(PCR)増幅を施すことにより、それが結合されたDNAを定量することで間

接的に定量される。増幅されたDNAは、例えば、DNA染色を伴うアガロースゲル電気泳動、酵素結合オリゴヌクレオチド吸着アッセイ(ELISA)、及び蛍光分光サーマルサイクラー(spectrofluorometric thermocycler)を用いるビーコン(beacon)オリゴヌクレオチドをプライマーとするPCRから選択された検出法によるような、多くの方法で定量することができる。

【0015】試料中の活性DNA結合タンパク質と共通の特異的免疫反応性部位を有する総タンパク質は、通常イムノアッセイ、例えば免疫反応性配列に特異的な抗体を用いるイムノブロットング(DNAアフィニティイムノブロットング(DAI))により定量される。

【0016】総タンパク質を測定する別の実施態様において、総タンパク質は、その免疫反応性部位に対する抗体により試料から取り出される。総タンパク質に結合するように処理されたDNAは、この総タンパク質に結合される。次に結合したDNAは、PCRにより増幅され、かつ定量され、総タンパク質に比例した数値結果を生じる。

【0017】より詳細には、例として、試料中の、DNA結合タンパク質と共通の特異的免疫反応性部位を少なくとも1個有する総タンパク質は、総タンパク質を含有する液体試料に、SDS-ゲル分画、それに続くイムノブロットングによる定量を、免疫反応性配列と反応性の同じ抗体を用い、結合タンパク質を決定するためのイムノブロットングと並行して行い、かつ総タンパク質の量を結合タンパク質の量と比較することによって、定量することができる。

【0018】生物学的試料中のDNA結合タンパク質のDNA結合を直接定量し、かつ試料中の、DNA結合タンパク質と共通の特異的免疫反応性部位を少なくとも1個有する総タンパク質と比較する一般的方法の実施態様は、下記の工程を含む：

- a) 試料を処理し、DNA結合タンパク質を含有する総タンパク質を含む液体を得る工程；
- b) 物質によりDNA結合タンパク質が特異的に結合することができる結合部位を含むDNA鋳型を作出し、結合配列に干渉することなく、液体からDNAが取り除かれることが可能である部位を提供する工程；
- c) DNA結合タンパク質を含有する液体を、DNA鋳型と共にインキュベーションし、DNA結合タンパク質をDNAと特異的に結合させ、複合体を形成する工程；
- 【0019】d) 結合したDNA結合タンパク質を伴うDNA鋳型を、提供された除去可能部位を用いて、液体から除去する工程；
- e) 結合したDNA結合タンパク質をDNAから分離する工程；
- f) DNAに結合したタンパク質を定量する工程；
- g) 液体中の総タンパク質を定量する工程；及び
- f) DNA結合タンパク質の量を総タンパク質と比較し、総タンパク質中の結合及び未結合のタンパク質の相対割合

を反映している指標を得る工程。

【0020】ほとんどのDNA結合タンパク質は、細胞の核内に局在化したDNAと共に認められるので、DNA結合タンパク質は通常核タンパク質であり、かつ通常被験試料は核物質を含有するが、これは常ではない。その他の生物学的試料、特に排出された核の廃棄物を含み得るもの、例えば血清又は腹水を用いることができるが、最も一般的な被験試料の給源は、細胞溶解液、例えば腫瘍細胞溶解液、タンパク質である。

【0021】本発明において、様々な分子量を有する多数の異なるDNA結合タンパク質を、異なるDNA結合タンパク質が特異的に結合することができる結合部位を含む多数のDNAを用いて、同時に定量することができる。このような場合、特異的結合配列を含むDNAは全て、結合配列に干渉することなく、処理されたDNAを液体中の他のDNAから分離することを可能にする部位を提供するように、物質により処理することができる。この結合タンパク質は、異なる分子量を有し、その結果結合配列に干渉することなく液体中の他のDNAから分離されるべき処理されたDNAの検出及び定量の間は、互いに干渉しない。

【0022】先に記載したDNAアフィニティイムノプロットティングを、下記の研究又は治療目的で 사용할ことができる：(1)特定疾患に関連した活性DNA結合タンパク質の検出；(2)DNA結合タンパク質及びそれらの関連タンパク質の単離及び同定；並びに(3)DNA／タンパク質相互作用を標的化する化合物のスクリーニング。高感度DNAアフィニティPCRを、予防的及び治療的臨床試験における中間エンドポイントとして、例えば分子診断における臨床的に重要な微量のDNA結合タンパク質の検出において、並びに個々の患者の腫瘍の分子プロファイリングに用いることができる。分子プロファイリングは、治療を決定する上で患者と担当医にとって力となり得る。この試験は更に、所定の患者疾患を惹起する分子欠損を標的化した個々の療法にとって今後有用であろう。

【0023】

【発明の実施の形態】特に指摘しない限りは、本願明細書の文中において下記の用語及び略号は、記されたことに関連する意味を持つ。「291細胞」は、周知で容易に入手できる形質転換していないマウスの上皮細胞株由来の細胞である。「3C3 DNA」は、対をなさないシトシンを含むミスマッチDNA鋳型である。「2C3C DNA」は、ミスマッチしたシトシンを含まない3C3 DNAの対照DNAである。

【0024】「アガロースゲル電気泳動」は、アガロースゲルを通して電気泳動することにより、サイズ別にDNAを分離する周知の方法である。「アポトーシス」はプログラムされた細胞死である。「ATM」は、血管拡張性失調症の突然変異である。「ビオチン分子」は、アビジン、ストレプトアビジンに特異的に結合する分子量244の分子である。「ビオチン化」は、1個以上のビオチン

分子との共有結合による修飾を意味する。「ブロッキングDNA」は、DNA結合反応において非特異的部位を占領することにより、特異的DNA結合の特異性を増強するために使用される、非特異的DNAである。「BSA」は、ウシ血清アルブミンである。

【0025】「細胞株480」は、周知の容易に入手できるヒト腺癌細胞株である。「CL-4B」は、市販の不活性クロマトグラフィーの支持体マトリックスであるセファロースCL-4Bである。「DAI」は、本発明のDNAアフィニティイムノプロットティングを意味する。「DAP」は、DNAアフィニティポリメラーゼ連鎖反応を意味する。

【0026】「DNA結合タンパク質」は、タンパク質のDNA活性型、すなわちDNA分子上の特定部位に特異的に結合し、かつDNAの機能に影響を及ぼすタンパク質を意味する。クレームにおいて使用されるように「DNA結合タンパク質」は、DNA上の特定部位に特異的に結合することのない型とは対照的に、活性結合型のタンパク質を意味する。文章から明らかなように、本願明細書において「DNA結合タンパク質」は、そのDNA結合(活性)型及び非結合(不活性)型の両方、すなわち下記において集合的に「総タンパク質」の中のタンパク質の特定の型を意味するよう総称的に使用される。

【0027】クレームにおいて使用されるように「DNA鋳型」は、特定のDNA結合タンパク質について特異的結合部位を有するように特異的に選択又はデザインされたDNA型である。「D01」は、p53タンパク質に特異的なポリクローナル抗体である。「DTT」は、還元状態で-SH基を維持する還元剤であるジチオトレイトール(dithiorty threitol)である。「ELISA」は、固相酵素免疫検定法である。「ELOSA」は、酵素結合オリゴヌクレオチド吸着アッセイである。「EMSA」は、電気泳動移動度シフト分析である。

【0028】「エピトープ」は、抗体により認識されたタンパク質の一部である。「ER」は、エストロゲン受容体である。「ERE」は、エストロゲン応答配列である。「エストラジオール」は、卵巣で生成されるステロイドである。

【0029】「フルオレセイン」は、本願明細書においてオリゴヌクレオチドのハプテンの標識として使用される蛍光物質である。「発蛍光団」は、蛍光を発生する物質である。「FNA」は、穿刺吸引である。「ハプテンー標識したオリゴヌクレオチド」は、例えばフルオレセイン、ジゴキシンゲニンのような、特異的抗体により認知可能な小物質で標識されたオリゴヌクレオチドである。

「ホリデイ連結」は、DNA組換えにおける中間体DNA構造である。「IHC」は、免疫組織化学を意味する。

【0030】「ImageQuant」は、電気泳動アッセイの分析のためにデザインされたソフトウェアプログラムである。「免疫沈降法」は、特異的抗体を用いるタンパク質の単離である。「kD」は、キロダルトン(測定単位)であ

る。「磁気ストレプトアビジン」は、ストレプトアビジンが架橋結合した磁気ビーズである。「微量配列決定」は、DNA又はタンパク質の配列を決定する方法である。

「オリゴマー化」は、異なるコンホメーションで会合するタンパク質の能力である。「オリゴヌクレオチド」は、少数のヌクレオチド単位の化合物である。「PAB 12 2」は、p53タンパク質に特異的抗体である。「Pab 42 1」は、p53タンパク質に特異的抗体である。「パリンδροームDNA」は、5'方向及び3'方向の両方から同じ様に読むことができるDNAセグメントである。

【0031】「PCR」は、ポリメラーゼ連鎖反応を意味する。「ポリ(dI-dC)」は、ランダムDNA配列(対照)である。「PR」は、プロゲステロン受容体を意味する。「SDS-PAGE」は、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(方法)である。「SSCP」は、1本鎖コンホメーション多型を意味する。「表面増強レーザー脱離/イオン化質量分析」は、タンパク質の重量を決定する周知の方法である。

【0032】「SV40 ラージT抗原」は、p53タンパク質に特異的に結合するSV40ウイルス由来のウイルスタンパク質である。「SW837」は、周知かつ容易に入手できるヒト腺癌細胞株である。「TATA」は、一般的転写を制御するヌクレオチド配列(チアミン及びアデニン)である。

「TBP」は、TATA結合タンパク質である。「TM細胞」は、マウスの腫瘍乳房細胞(mammary cell)である。「総タンパク質」は、特異的活性のあるDNA結合タンパク質と共通の特異的免疫反応性部位を有するタンパク質の特異的種類全てを意味する。総タンパク質は、特定種のタンパク質の活性型及び不活性型の両方を含む。「総タンパク質」に含まれるタンパク質は、同じ配列を有し、例えば通常80%以上、及び時には95%以上の配列同一性を有する、著しい長さのアミノ酸を有する。「トリトンX-100」は、非イオン性界面活性剤である。

【0033】第一の実施態様において、本発明は、手術時の腫瘍組織標本又は細胞からの組織溶解液における、DNAに結合する活性タンパク質及び総タンパク質の比を測定する方法を提供する。活性DNA結合タンパク質の検出は、ビオチン化されたDNA及び磁気ストレプトアビジンを用いるDNA結合タンパク質の濃縮により達成することができる。SDS-PAGEによるDNA結合したタンパク質及び総タンパク質の分画、その後の対応する抗体によるイムノブロッティングは、同時に複数のDNA結合タンパク質のDNA結合型及び総合型の測定を可能にする(但しそれらは異なる分子量を有する)。DNA結合したタンパク質及び総タンパク質は、同一条件下で検出されるので、これは、相対DNA結合活性及び機能的指標としての発現の客観的定量を可能にする。この機能的指標は、EMSA又はその他の常用のDNA結合アッセイによる絶対DNA結合の決定よりも、DNA結合タンパク質の機能的状態をより正確に反映している。このアッセイの有用性は、独自の構造を

持つDNAに結合するタンパク質の同定に拡大することができる。更にこの試験は、放射性同位元素を使用することなく、100 µg未満のレベルのDNA結合タンパク質を検出することができる。

【0034】第二の実施態様において、本発明は、コア穿刺生検又は他の微小臨床標本から得られる微量試料でDNAの結合活性を検出することが可能な高感度のDNA結合アッセイを提供する。試験したDNA結合タンパク質のDNA結合活性の読み値として、タンパク質-結合したDNAを増幅するために、PCRが、このアッセイに組み込まれている。

【0035】この試験は、非常に感度が良いので、特定の結合タンパク質のわずかに数百個の分子を検出することができる。説明された方法は、例えばp53及びエストロゲン受容体(ER)を定量するための、各々、SV40 T抗原及びストレプトアビジンの二官能性融合タンパク質並びにビオチン化したエストラジオールを用いる、PCRベースの検出システムとして使用することができる。このPCRベースの検出システムを用いるp53及びERの定量は、DNA結合タンパク質の機能的指標の算出のための分母のみではなく、DNA結合タンパク質のその他の生化学的特徴を評価するための参考値、例えばp53のコンホメーション又はERのリガンド結合なども提供する。

【0036】本発明の方法は、重症度、予後及び治療に対する細胞反応の完全性を反映することによる、ヒト疾患において重要であるDNA結合タンパク質の機能的状態の検出及び定量に使用することができる簡便で非放射性のアッセイを提供する。これらのアッセイの履行は、医師及び患者が、例えば癌療法において、治療様式を決定しかつ治療の間治療に対する反応をモニタリングする上で有用であろう。p53、ER及びその他のDNA結合タンパク質の機能的状態は、患者の予後、生存及び適応可能な治療に対する反応を予測する際に、免疫組織化学法又はその他の現在のタンパク質発現のみの評価よりも、より強力なものであるはずである。患者の腫瘍タンパク質の機能的プロフィールのデータベースがこれらのアッセイの履行を通じて形成されるので、患者及び医療技術提供者はこれを用いて、適応可能な標準的治療の中からより情報に富んだ決定を行うか、もしくはより積極的実験的治療を選択するか又は利益の証拠を基に治療を選択しないことができる。

【0037】本発明の方法は、DNA結合タンパク質であるp53及びエストロゲン受容体タンパク質(ER)に関連した下記の考察により例示することができる。本願明細書で参照された参考文献は、背景技術として参照のために組み入れられている。

【0038】本発明の実施態様であるDNAアフィニティイムノブロッティング(DAI)アッセイは、EMSAのような標準のDNA結合アッセイを用いて再現性を持って検出可能なレベルを越える感度レベルで、特異的DNA/タンパ

ク質相互作用を検出することを目的としている。DAIの新たな特徴は下記の点である：1)試料中の総特定DNA結合タンパク質の機能的画分を定量する能力；2)臨床及び研究の利益のための、この機能的評価の腫瘍及び細胞試料への適用；3)同一試料中の複数のDNA結合タンパク質を機能的に評価する能力；及び4)下記に詳述したような、ヒト疾患に関連した組織及び細胞試料に対し特異的で、定量可能かつ適用可能なものにするための該方法の修飾。DAI法は、2種の常用の技法であるビオチン/ストレプトアビジンアフィニティクロマトグラフィー(Kadonaga J. T. 及びTjian R., 「配列-特異的DNA結合タンパク質のアフィニティ精製」, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83:5889-5893 (1986))及びイムノブロッティング(Burnette W. N., 「ウェスタンブロット法：タンパク質のドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲルから未修飾のニトロセルロースへの電気泳動的移動及び抗体及び放射性ヨウ素標識したプロテインAによるラジオグラフィー検出」, *Analytical Biochemistry*, 112:195-203 (1981))を組合せ、かつ修飾したものである。

【0039】この戦略は、ストレプトアビジンとのインキュベーションによりビオチン化された標的DNA分子との特異的複合体中の内因性DNA結合タンパク質を豊富にし、次にイムノブロッティングにより特異的に特定のタンパク質を検出する(図1)。より詳細に述べると、図1は、機能的指標において使用するための総p53及びDNAに結合したp53タンパク質の定量を図示している。図1は、DNAアフィニティイムノブロッティングの概略図である。DNA結合反応において、DNA結合において活性があるp53は、p53コンセンサス配列を伴うビオチン化されたDNA二重鎖(duplex)に結合するであろう。このp53-ビオチン化されたDNA複合体は、磁気ストレプトアビジンにより捕獲され、かつSDS-ゲル分画、それに続けてp53抗体によるイムノブロッティングが施される。p53の相対DNA結合活性は、総p53のシグナル強度に対するDNA結合したp53の強度により、機能的指標として算出することができる。

【0040】本発明を裏付けるために実施された実験は、PuPuPuCATGPyPyPy(配列番号：1)の2個の反復を伴うパリンドロームDNAモチーフを含むコンセンサスp53結合配列に対するp53タンパク質のDNA結合を測定した(El Deiry W. S., Tokino T., Velculescu V. E., Levy D. B., Parsons R., Trent J. M., Lin D., Mercer W. E., Kinzler K. W. 及びVogelstein B., 「p53腫瘍抑制の可能性のあるメディエータであるWAF1」, *Cell*, 75:817-825 (1993))。p53コンセンサス配列を含むDNA二重鎖の一方の鎖の5'末端はビオチン化され、かつビオチン化されていないその相補鎖によりアニーリングされた。DNA結合反応は、DNA結合緩衝液(20mM Tris-HCl [pH7.2]、80mM NaCl、1mM EDTA、0.1% Triton X-100、4%グリセロール、

5mM DTT)400 μ l中に、腫瘍組織試料又は培養した腫瘍細胞の高塩抽出物200 μ g、ビオチン化されたp53 DNA二重鎖10pmol、ポリ(dI-dC)2 μ g、及び磁気ストレプトアビジンビーズ0.1mgを含有するDNA結合溶液中で行われた。このDNA/タンパク質複合体を、磁気を用いてペレット化し、かつDNA結合緩衝液で3回洗浄した。結合したタンパク質を、対応する高塩抽出物40 μ gのみで、ポリアクリルアミド/SDSゲル、それに続くp53に特異的抗体を用いるイムノブロッティングにより分析した。

【0041】DAIの重要な要素は、反応容量に限度が無いことであり、これはDNA結合反応液中の細胞溶解液量の増加により、所望の感度を達成することができる。EMSAは、反応容量により、すなわち非変性ゲルのウェルのサイズにより、及び組織試料から到達可能なタンパク質濃度により制限される。EMSAで可能な量の4倍に核抽出物の容量を増すことにより、我々は、反応液内のアクチベーターとしてのPAb421が存在しない状況で、正常上皮291細胞において、p53タンパク質のDNA結合活性を検出することができた(図2A)。核抽出物120 μ gでのDAIのシグナル強度は、核抽出物30 μ gの直接イムノブロッティングの値に匹敵し、このことは、未処置の細胞中の検出可能な総p53タンパク質の1/4がDNA結合活性を有することを示している。先行するアッセイに勝る利点は、1)低い内因性レベルの活性p53を有することが分かっている未処置の正常細胞に対する感度；及び、2)in vitro反応において、人工的安定化剤としてPAb421 p53抗体を使用せずに、p53活性を検出する能力があることである。

【0042】個別の工程において2種の特異的物質を使用することは、DAIアッセイの特異性を確実にする。p53の場合の第一の物質は、DNAに結合することが可能なp53タンパク質を捕獲するビオチン化されたp53-特異的コンセンサスDNA断片である。p53の場合の第二の物質は、イムノブロッティングによるDNA-結合したp53の検出のためのp53特異的抗体である。図2Bに示されるように、p53タンパク質によるDNA結合は、ビオチン化されたp53コンセンサス配列に対しては特異的であるが、突然変異した対照配列に対しては特異的でない。このp53シグナルは、ビオチン化されていないp53コンセンサス配列により無効にされるが、しかし競合体としてのポリ(dI-dC)又は変異体p53 DNAでは無効にされない。更にDAIの特異性は、様々なp53遺伝子型を持つ細胞からの核抽出物を用いて確立された(図2C)。DAI反応(活性p53タンパク質を示す)は、核抽出物のアリコートにおいて実施され、かつ該アリコートの1/5の直接イムノブロッティング(総p53タンパク質を示す)に近似している(adjacent to)ことが示された。これらの値は、試料間の比較に便利な機能的指標の計算に使用した[機能的指標=DNA結合したp53のシグナル強度÷総p53のシグナル強度]。この場合、細胞試料中の機能的p53タンパク質の真の割合は、機能的指標を5で割ることにより概算される(直接イムノプロ

ッティング対DAIの溶解液タンパク質投入量、各々、40 μ g及び200 μ gの間の差は、反応の両タイプの直線範囲内に収まるシグナル強度を生じるように選択した)。有意なDNA結合活性がヒト293細胞において検出され、これはそれらの野生型p53遺伝子型と一致する。DNA結合に関するp53活性は、総p53タンパク質のおよそ1/3であった(機能的指標を5で割って算出)。ヒト腺癌細胞株SW837及び子宮頸癌細胞株C-33由来のp53タンパク質はDNAに結合せず、このことは、それらの変異体遺伝子型と一致した(SW837における248位 Arg>Trp; C-33における273位 Arg>Cys)。しかし、p53の273位にArg>Hisの突然変異を伴う腺癌細胞株480においては、DNA結合活性が検出された。これら2種の異なるp53の同じコドン(273位)での突然変異が、p53 DNA結合活性において劇的な差異を生じる点は興味深い。273位のArg>His変異体の活性DNA結合は、EMSAを用いて観察した(Park D. J.、Nakamura H.、Chumakov A. M.、Said J. W.、Miller C. W.、Chen D. L.、及びKoeffler HP、「p53変異細胞株における内因性p53のトランス活性化及びDNA結合能」、Oncogene、9:1899-1906 (1994))。しかし野生型p53及びその変異体のDNA結合活性の差異をより正確に測定し、かつDAIを用いて比較することができる。p53のDNA結合活性は、480細胞において顕著でありにもかかわらず、機能的指標により示されるものは野生型p53よりも著しく弱い(各々、0.3及び1.5)。

【0043】要約すると図2は、DAIによるp53のDNA結合活性を説明している。図2Aは、DAIによるDNA結合におけるp53タンパク質活性の定量を示している。291細胞の溶解液の指定量に、PAb122を用いるDAIを行った。溶解液のアリコート30 μ gを、総p53タンパク質の参照値として負荷した。図2Bは、配列一特異的p53 DNA結合についての競合を示している。291溶解液のアリコート200 μ gに、示された競合物質を用いるDAIを行った。図2Cは、異なるp53遺伝子型を持つ細胞内の機能的p53タンパク質の測定値を示している。これらの各細胞株(本文参照)の核抽出物200 μ gに、DAIを行い(+)、かつ総タンパク質(-)と比較した。

【0044】これらの研究は、Dan Medinaが開発したマウス乳房細胞モデルを使用し、乳房細胞におけるp53野生型及び変異体タンパク質に拡大された(Medina D.、Kittrell F. S.、Liu Y. J.及びSchwartz M.、「TM腫瘍発現前の乳房派生物の形態学的及び機能的特性」、Cancer Research、53:663-667 (1993a))。加えて、これらの研究は、DAIによって検出可能な配列一特異的DNA結合と先のEMSAの結果を比較し、かつDAIの結果がp53の転写活性を予測したかどうかを決定する機会をもたらした(Medina D.、Kittrell F. S.、Oborn D. J.及びSchwartz M.、「腫瘍発現前のマウス乳房上皮細胞における増殖因子依存性及び遺伝子発現」、Cancer Research、53:668-674 (1993b))。先行する研究は、p53遺伝子は、弱い腫瘍発生性

細胞株であるTM9及び10において野生型であり、かつ弱い腫瘍発生性株である株(TM13)及び高い腫瘍発生性である株(TM4)においては変異体であることを示している。

【0045】この乳房細胞モデルにおけるp53の機能的状態をDAIにより試験し、かつ結果を図3に示した。TM3及びTM4からのp53タンパク質は、DNAに結合しないか、もしくは結合したとしても無視できるレベルであり、これはそれらの変異体の遺伝子型に一致している。TM10細胞の場合、DNA結合活性は、野生型p53遺伝子型と一致している。しかしTM9由来のp53タンパク質は、同じく野生型p53のみを含むが、これはDNAとの結合に失敗した。従ってDAIは、野生型p53遺伝子型を伴う乳房腫瘍；野生型であるが非-機能的p53を有する腫瘍、及び機能的野生型p53を有する腫瘍のサブセットを識別した。これは、p53が、p53の突然変異以外の欠損により不活化されるという証拠に一致している。更にDAIの結果は、これらの細胞におけるEMSAの結果を反映しており、更に総タンパク質対照及び試料間の比較に関するより定量的情報を提供するという利点を有した。DAIが、これらと同じ細胞を使用する並行実験において、DNA損傷剤によるp21誘導を推測したことは、機能の指標としてのDAIにとって重要である。

【0046】加えて、DAI特有の利点は、これは複数のDNA結合タンパク質を、これらが異なる分子量であるならば、同時に測定することができることである。これは、エストロゲン、プロゲステロン及びアンドロゲンのステロイド受容体のような別のDNA結合タンパク質が予後診断的因子として同定されている、乳癌、卵巣癌及び前立腺癌において特に有意である。従って、我々は、ERのDNA結合活性を、TM細胞のp53と共に試験した(図3)。ビオチン化されたp53コンセンサスDNA及びエストロゲン受容体エレメントDNAを、同じ反応液に添加した。p53(53kD)及びER(56kD)はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により明確に分離することができるので、DNA結合したタンパク質を、同一プロット上でp53及びERに対する抗体でイムノプロットングすることにより分析した。特に興味深いのは、免疫学的に検出可能なERを伴う試料の全ては、相当するDNA結合活性を示さなかったことである。このことは、タンパク質内容物(protein content)による機能を識別することにより、DAIには予後診断に価値のある更なる情報を追加する可能性を有することを示唆している。更にDAIアッセイは、追加された異なる分子量のDNA結合タンパク質を検出する可能性を有している；その一例として、94kDのプロゲステロン受容体がある。単独の反応において複数の因子を測定する能力は、マルチパラメータ分析、分子診断、及び治療プランに関する通しアッセイとしてDAIを開発することを可能にする。

【0047】本発明の別の態様は、腫瘍組織の特性により影響を受けたDNA結合活性を標準化するための組織の

特性対照を確立している。基本転写因子は、組織の特性に関する内部対照として選択される。一例は、TATA結合タンパク質(TBP)であり、これはTATAボックスと称されるTATAAAA (配列番号: 2) 及び密に関連した配列を認識する基本転写因子である。TBPの分子量は36Kdであり、p53 (53Kd) 及びER (65Kd) から区別することができる。TBP結合部位TATAAAA及びそのフランキング配列を伴うビオチン化されたDNAは、組織溶解液を含有する溶液中で反応され、かつp53 DNA二重鎖がビオチン化される。TBP及びp53タンパク質を含有するDNA/タンパク質複合体は、前述の磁気ストレプトアビジンビーズにより捕獲される。DNA/タンパク質複合体は、SDS-PAGEにより分画され、その後TBP 及びp53に対する抗体によりイムノプロットされる。TBPの機能的指標により示された溶解液特性は、DNA結合したTBPのシグナル強度を、総TBPの強度で割ることにより算出される。この値は、同じ反応におけるp53及びその他のDNA結合タンパク質について作成された機能的指標の標準化に使用することができる。p53についての絶対機能的指標は、DNA結合したp53についてのシグナル強度を、総p53タンパク質の強度で割ることにより算出される。p53の相対機能的指標は、TBPの絶対指標で割ることにより決定される(p53の機能的指標=[DNA結合したp53のシグナル強度/総p53のシグナル強度]÷[DNA結合したTBPのシグナル強度/総TBPのシグナル強度])。

【0048】まとめると、図3は、マウス乳房モデルにおけるp53及びERの機能的分析を示している。各細胞株由来の核抽出物200 µgを、p53コンセンサス配列及びERE配列を含有するビオチン化されたDNAカクテルと反応させた。ゲルは、ER抗体(HC-20)及びp53抗体(122)でプロットした。これらのバンドをImageQuantを用いて定量した。機能的指標を、DNA結合したタンパク質(+)のシグナル強度を、総タンパク質40 µg(-)のシグナル強度で割ることにより算出した。

【0049】DAIの有用性は、DNA結合タンパク質の分析においてビオチン化されたDNA二重鎖を用いることに加えて、例えばビオチン化されたDNAを、ホリデイ連結を用いることによりDNA組換えにおける中間体DNA構造(Holliday R., 「遺伝子交換及び遺伝子転換における分子態様」、Genetics, 78:273-287 (1974))、又はミスマッチ構造を持つDNAを用いて独自のDNA構造に結合するタンパク質を同定することに拡大することができる(図4)。これらの結合したタンパク質がわかっているならば、この結合したタンパク質を特異的抗体により検出することができる。あるいは、結合したタンパク質は、ゲル分画したポリペプチドの微量配列決定(AlborA., Kaku S. 及びKulesz-Martin, M., 「p53活性ヒトトポイソメラーゼIの野生型及び変異型: 変異体における機能獲得に関する可能性のあるメカニズム」、Cancer Research, 58:2091-2094 (1998))、又はタンパク質チップ(protein chip)

分析との組合せ(Kuwata H., Yip T.T., Yip C.L., Tomita M. 及びHutchens T.W., 「ラクトフェリンの細菌ドメイン: SELDIアフィニティ質量分析による血清中のラクトフェリンの検出、定量及び特徴決定」、Biochemical & Biophysical Research Communications, 245:764-773 (1998))により分析することができる。結合したタンパク質は、DNase又は制限酵素(制限部位はこの目的のためにビオチン化されたDNAに導入されている)による消化により、ストレプトアビジン/ビオチン化されたDNA複合体から溶離することができる。このDNase及び制限酵素は、消化後ヘパリン-アガロースビーズに吸着することができる。溶離したタンパク質は、SDS-PAGEに適しており、問題のタンパク質は、微量配列決定のために切出すことができる。あるいは、溶離したタンパク質は、表面増強レーザー脱着イオン化質量分析によるタンパク質チップ分析を施すことができる。

【0050】要約すると、図4は、DNAアフィニティイムノプロットによる、ミスマッチDNA構造へのp53結合の同定を示す。核抽出物は、291細胞から、50J/m² UV-照射後の所定の時点で調製した。ミスマッチDNAへの結合は、ビオチン化されたミスマッチDNA(3C3)0.5 µg、及びその対照DNA 3C3プローブを含む反応液中の核抽出物200 µgで分析した。このDNA-タンパク質複合体を、磁気ストレプトアビジンビーズで捕獲し、かつ1%SDS-PAGE、それに続けてPAb122によるプロットを行った。

【0051】DNA-タンパク質相互作用を標的とする化合物のスクリーニングのための現在のアッセイは、主に、例えば組換えタンパク質及び放射標識したDNAを使用するEMSAのような、in vitro DNA結合アッセイを基にしている。臨床で使用可能な薬物となる化合物の開発のために、化合物の機能は、単に分子レベルのみではなく、細胞レベル、より重要なことには生理的レベルにおいても評価されなければならない。現在のアッセイによりもたらされたDNA結合のエンドポイントを定量する感度及び能力のために、DNA-タンパク質相互作用を標的とする能力に関する化合物スクリーニングは、単に分子レベルの現在の実践のみではなく、細胞及び機能-生理レベルでも行われ得る。DAIの感度及び特異性は、被験物質の存在下でのDNA結合アッセイにおいて、細胞又は組織溶解液を使用することにより、複雑な細胞の生理的状況において化合物の機能を評価することを可能にしている。より重要なことは、これは、特異的DNA結合タンパク質に対する作用のDAI及び定量のために組織を収集することにより、動物の治療及び標的組織における評価を可能にすることである。

【0052】本発明の第二の実施態様は、DNAアフィニティPCRである。癌は比較的早期に診断されるので、手術時の病理標本のサイズは縮小する。加えて、より小さい手術標本が診断アッセイにおいて求められることが増

えつつある。従って、微量試料で十分な新たなアッセイ感度が、癌遺伝子に関する基本的知識を臨床の実践的適応に当てはめるための明確な利点を供するであろう。更に、臨床アッセイは、コア生検又は穿刺吸引(FNA)からの標本のみが入手できる標本であるような予防的治験手段における、より小さい腫瘍又は高リスク集団の標本抽出に挑戦している。FNA及びコア生検から得た微量試料のp53及びその他のDNA結合タンパク質の機能評価は、単に診断法及び治療法のみではなく、可能性のある化学的防御法(chemoprevention)に関する情報も提供することができる。DAIの欠点のひとつは、最低でも腫瘍組織100 mg(0.3mm³)を必要とすることである。これは、多くの手術標本において達成可能であるが、コア針生検又はFNAから得られる標本の大きさよりも大きい。DAIの増強された感度は、少なくとも一部は増大された試料負荷を基にしており、DAIが微量腫瘍試料のために開発されることを疑うものではない。

【0053】本発明の第二の実施態様は、微量腫瘍試料中のp53及びその他のDNA結合タンパク質のDNA結合活性の検出を可能にする、より感度の高いアッセイである、DNAアフィニティPCR(DAP)を示している。DNAアフィニティPCR(DAP)の戦略は、例えば図5に示したような、固形マトリックス上への特異的タンパク質-DNA複合体の捕獲、それに続く結合したDNA断片のPCR増幅である。より詳細に述べると、図5は、DNAアフィニティアッセイの概略を示している。図5Aは、溶解液中の機能的DNA結合タンパク質が、コンセンサス配列及び制限部位を伴うDNA鋳型に結合しているDNAアフィニティPCRを示している。結合したDNAは、マイクロプレートに固定された抗体により捕獲される一方で、未結合のDNA鋳型は、制限酵素により消化される。結合したDNAのシグナルは、PCRにより増幅されるであろう。図5Bは、p53タンパク質定量のために改変されたイムノPCRを示している。溶解液中のp53タンパク質は、SV40Tag/ストレプトアビジン融合タンパク質及びビオチン化されたDNA鋳型と共に複合体を形成するであろう。この複合体は、マイクロプレート上に固定された抗-p53抗体に捕獲されるであろう。結合したDNAのシグナルはPCRにより増幅される。

【0054】図5Cは、ER定量のために改変されたイムノPCRを示している。エストロジオール結合について活性があるERタンパク質は、ビオチン化されたエストロジオール及びストレプトアビジン-ビオチン化されたDNA鋳型と共に複合体を形成するであろう。この複合体は、マイクロプレート上に固定された抗-ER抗体により捕獲される。結合したDNAのシグナルはPCRにより増幅される。増幅されたDNAは、1)アガロースゲル電気泳動；2)ビオチン及びその他のフルオレセインで標識した1個のプライマーによる酵素結合オリゴヌクレオチド吸着アッセイ(ELOSA)；又は、3)蛍光分光サーマルサイクラーによる、プライマーとしてビーコンオリゴヌクレオチドを

用いるPCRにより、検出及び定量することができる。DAPの主な利点は、現在利用可能な最も強力な増幅システムであるPCRにより結合したDNAが増幅されることに起因した、高い感度である(Saiki R.K.、Scharf S.、Faloona F.、Mullis K.B.、Horn G.T.、Erlich H.A.、及びArnheim N.、「鎌状赤血球貧血症の診断のためのβ-グロブリンゲノム配列の酵素的増幅及び制限部位分析」、Science、230:1350-1354 (1985))。一般的な反応条件下で、数百万倍の増幅を容易に達成することができる。理論的には、酵素結合オリゴヌクレオチド吸着アッセイ(ELOSA)(Hahn M.、Dorsam V.、Friedhoff P.、Fritz A.、及びPinguet A.、「選択的に消化され増幅された試料及び対照DNAの固相酵素免疫検定法によるポリメラーゼ連鎖反応の定量」、Analytical Biochemistry、229:236-248 (1995))と組合わせたDNAアフィニティPCRは、標準ELISAよりも数百万倍感度が高い。

【0055】ELOSAは、特異的DNA配列0.1~1 fmolで検出が可能である。従って、DNAアフィニティアッセイとELOSAの併用は、試料、すなわち少量の腫瘍細胞あたりの少量のDNA結合事象の定量を考えられる限り可能にしている。しかし、非特異的DNA結合は、DAP感度に対する大きい障害である。強力なPCRは、特異的に結合したDNA及び非特異的に結合したDNAの両方を増幅するであろう。非特異的DNA結合は、固相マトリックス、固定した抗体、及び非特異的タンパク質の間で生じることがある。DAPの感度のために、2、3の非特異的に結合したDNAも検出されることがある。従って、DNAアフィニティの感度は、陽性試料と陰性試料の間で有意差に達するために、非特異的DNA結合よりも大きく数的に優位な特異的DNA結合事象を必要とする。従って、非特異的DNA結合を減らすことは、DNAアフィニティPCRの感度にとって重要である。

【0056】非特異的結合を減少するために、突然変異された結合部位及び鋳型DNAのためのプライマー配列の欠損以外は特異的鋳型DNAと同じであるようにデザインされた、ブロッキングDNAを用いることができる。例えばp53及びエストロジオールの場合、隣接するプライマー配列を伴わない変異体p53又はエストロゲン応答配列(ERE)DNA断片を、サケ精巣DNAの代わりに、ブロッキングDNAとして使用することができる。結果的にこのブロッキングDNAは、p53及びERタンパク質で認識されないか、又は鋳型プライマーによるPCRで増幅されない。第二に、制限部位を、各DNA結合タンパク質の特異的結合部位のスペーサー領域、フランキング領域又は両領域に挿入することができる。配列-特異的結合は、対応する制限酵素による消化から制限部位を保護するであろう。未結合のDNAは消化され、従ってその後のPCR増幅の鋳型として利用不可能となる。いくつかの制限消化及び特異的DNAによるブロッキングの組合せにより、数桁の開きがある非特異的結合が減少することが予想される。例え

ば、3種の制限部位が、各々、スパーサー領域並びに5'及び3'の直近のフランキング領域に導入され、その結果これらの制限酵素の導入は、特異的DNA結合とは干渉しない。3種の制限部位の組入れは、DNA結合アッセイにおける非特異的DNA結合を排除するための制限消化の3種の選択肢又は組合せをもたらす。

【0057】このDNA鋳型及びブロッキングDNAの例は、該結合部位のプラスミドベクターへのクローニングにより構築された、p53又はER結合部位を伴う200bp DNA鋳型である。この鋳型は、該結合部位に隣接するプライマー対を用いるPCRにより合成される。EcoRI制限部位を有するp53コンセンサス配列(AGGCATGTCTgaattcAGGCATGTCT)(配列番号：3)が、中央のスパーサーに導入され、かつ5側末端のXhoI及び3側末端のBamHIが各々合成される。3個の制限部位の組入れは、DNA結合アッセイにおいて非特異的DNA結合を取り除くための制限消化の3種の選択肢又は組合せをもたらす。二重鎖DNAは、アニーリング緩衝液(150mM NaCl、10mM Tris HCl[pH 8.0]、5mM EDTA)中にオリゴDNAを等量混合し、かつ95℃で5分間加熱し、その後60℃で30分間冷却することにより調製される。アニーリングしたDNAは、pBluescriptへクローニングし、XhoI及びBamHIで消化した。クローン化されたp53結合部位に隣接している5側鋳型プライマー配列(TTAAGTTGGGTAACGCCAGG)(配列番号：4)及び3側プライマー鋳型(AAAGGGAACAAAAGCTGGGT)(配列番号：5)が、増幅の鋳型のために合成された。210bp DNA鋳型は、隣接するプライマーを用い、pfu DNAポリメラーゼにより増幅された。増幅された鋳型は、DNA結合アッセイのために精製及び定量される。

【0058】特異的ブロッキングDNAを作出するために、変異体p53コンセンサスDNA(AGGCAAGgCaGGCAAGgCa)(配列番号：6)が、XhoI及びBamHI部位を破壊する以外は前述のように、野生型配列の同じ制限部位にクローン化される。該鋳型プライマー配列を除外する5側ブロッキングプライマー(AACGCCAGGGTTTCCCA)(配列番号：7)及び3側ブロッキングプライマー(TATCGATACCGTCGACCT)(配列番号：8)を、ブロッキングDNAの作出に使用することができる。このブロッキングDNAは、突然変異された結合部位及び鋳型DNAのためのプライマー配列の欠損以外は特異的鋳型DNAと同じであることが望ましく、その結果このブロッキングDNAは、p53及びERタンパク質により認識されないばかりでなく、鋳型プライマーを用いるPCRにより増幅されることもないが、しかし特異的鋳型DNAへの非特異的結合の可能性を低下するためにタンパク質の非特異的結合との競合を提供することができる。

【0059】DNA結合反応は、被験組織又は細胞の高塩抽出物、鋳型DNA 0.1pmol、ブロッキングDNA 10pmol、及び対応するDNA-タンパク質複合体を捕獲する特異的抗体10ngを含有するDNA結合溶液中で行うことができる。制限消化で未結合及び非特異的に結合したDNA鋳型を取

り除いた後、この反応液を、二次抗体(又は一次抗体がビオチン化されている場合はプロテインAもしくはストレプトアビジン)で被覆された新たなマイクロタイタープレートに移される。この移動は、固相マトリックスへの非特異的DNA結合を除外するために必要である。非特異的DNA結合は更に、非特異的結合のためのより小さい表面積を提供するV型マイクロウェルを用いて減少することができる。特異的に結合したDNA鋳型を溶離し、かつPCR増幅を行うことができる。この増幅されたDNAは、アガロースゲル電気泳動及び臭化エチジウム染色(図7)、又は下記により良い定量のための検出システムにより測定される。臭化エチジウム染色は、最低10ng DNAを検出するが、これは210bp DNAの 5×10^{10} 分子に相当する。臭化エチジウム染色により検出可能なレベルまで、少ないDNA鋳型を増幅することは実行可能なことではない。このアッセイ感度を数百個の細胞においてDNA結合事象の検出が可能なレベルまで高めるために、酵素結合オリゴヌクレオチド吸着アッセイ(ELOSA)を、この目的に合うよう変更することができる。ELOSAは、抗原の代わりにハプテン標識したオリゴヌクレオチドを検出する、ELISAを基本とした技術である。一般にELOSAの感度は、 $0.1 \sim 1 \text{ fmol}$ ($10^7 \sim 10^8$ 分子)であり、臭化エチジウム染色よりもはるかに感度が良い。加えてこれは、臭化エチジウム染色よりも広い定量のための直線範囲を有する。結合した鋳型DNAは、各々、ビオチン及びフルオレセインで標識した5'及び3'鋳型プライマーにより増幅することができる。結果的に、増幅されたDNAは、一端をフルオレセインで、他端をビオチンで標識することができ、その結果DNAは、マイクロプレート上でストレプトアビジンにより捕獲され、かつ発色体パラ-ニトロフェニルリン酸(pNPP)と複合した抗-フルオレセイン-アルカリホスファターゼにより検出される。アッセイ感度は、細胞数及びタンパク質濃度がわかっている細胞溶解液の連続希釈により測定することができる。

【0060】特に図7は、DNAアフィニティPCRによるp53のDNA結合活性の分析を示している。形質転換していない上皮細胞291(wt. p53)及びヒト子宮頸癌細胞C-33(mt. p53)由来の溶解液の指定量について、p53コンセンサス部位を含む210bp DNA二重鎖及びPAB421を用いるDNAアフィニティPCRを、抗-マウスIgGで被覆したマイクロタイタープレート中で行った。この結合したDNAは、PCRにより増幅し、かつ臭化エチジウム染色により視覚化した。

【0061】あるいは、プライマーとして分子ビーコンを用いる光学的(light)PCRにより、結合したDNAを測定することができる(Tayca S. 及びKramer F.R., 「分子ビーコン：ハイブリダイゼーション時に蛍光を生じるプローブ」, Nature Biotechnology, 14:303-308 (1996))。分子ビーコンは、5'末端に発蛍光団及び3'末端に消光分子を含む、1本鎖オリゴヌクレオチドである。DNA鋳型が存在しない場合は、分子ビーコンは、ヘアピンループを

形成し、消光分子に隣接するように発蛍光団を配置し、結果的に蛍光を生じない。DNA鋳型が存在する場合は、分子ビーコンは鋳型の相補的配列に結合し、発蛍光団を消光分子から分断する。この蛍光シグナルは、反応液中の増幅されたDNA量に比例しており、蛍光分光サーマルサイクラーによりPCR時に検出することができる(Wittwer C. T., Herrmann M. G., Moss A. A. 及びRasmussen R. P., 「急速サイクルDNA増幅の連続蛍光モニタリング」, Biotechniques, 22:130-131 (1997))。これらのシグナルは、各増幅サイクル時にプロットすることができる。最初の鋳型数は、蛍光分光サーマルサイクラーにより検出可能なシグナルレベルに必要なサイクル数を基にして算出することができる。最初の増幅でより多くのDNAが結合すると、蛍光検出の閾値に達するのに必要な増幅サイクルが減少する。

【0062】DNAアフィニティPCRにより、IHC単独に勝る患者腫瘍の分子プロファイリングに広げることが可能でp53機能の正及び負の読み値を提供することが可能である。しかし、機能的指標を算出する能力は、偽陽性及び偽陰性を避け、かつ更に個々の腫瘍の生物学的に意義のある活性を分類するための更なる利点を提供する。本発明の別の実施態様は、p53及びERのような結合タンパク質の定量的ための特異性及び感度が高い検出システムを提供する。イムノPCRは、微量の抗原の検出のために開発されている(Sano T., Smith C. L., 及びCantor C. R., 「イムノPCR：特異的抗体-DNA複合体による非常に感度の良い抗原検出法」, Science, 258:120-122 (1992))。これは、抗原-抗体相互作用の特異性及びPCRの感度を組合せた極端に感度の良い技術である。イムノPCRにおいて検出される抗原は、マイクロプレート上に吸着され、かつ特異的抗体により認識される。この結合した一次抗体の検出は、プロテインA及びストレプトアビジンの二重特異性融合タンパク質によるか、又はストレプトアビジンとの複合体中のビオチン化された二次抗体及びビオチン化されたDNAのいずれかにより行うことができる(Sano T. 及びCantor C. R., 「様々な特異的抗体複合体の工程作出を可能にするストレプトアビジン-プロテインAキメラ」, Bio/Technology, 9:1378-1381 (1991))。ビオチン化されたDNA分子は、PCRにより増幅することができる。しかしイムノPCRは、一般的な実践のための信頼できる道具としては開発されていない。イムノPCRの特異性は抗原-抗体相互作用のみにより左右されるので、避けることのできない非特異的相互作用が、感度に関するPCRの力を大きく制限している。加えて固相マトリックスへの抗原の吸着効率は、結合部位のその他の分子との競合のために様々な試料において変動する。これらの欠点は、一般的実践におけるイムノPCRの用途を大きく制限する。イムノPCRの特異性を改善するために、本発明は、抗原-抗体相互作用に加えて特異的相互作用を提供する。この追加の特異的相互作用

は、ビオチン又はストレプトアビジン部分及び関連タンパク質を含む融合タンパク質との特異的リガンドを用いて達成される。関心のあるタンパク質の生化学的特性を基に様々なストレプトアビジン融合タンパク質を設計することにより、この技法は、増強された特異性及び機能性を伴う、極めて低いタンパク質濃度の一般的検出に適用することができる。

【0063】実施例1：p53の定量

p53タンパク質は、トランス活性化、DNA結合、オリゴマー化、及びDNA結合調節に関連する、いくつかの個別のドメインにより構成された転写因子である。p53タンパク質に結合する多くの細胞タンパク質が同定されている。これらの結合されたタンパク質は、ストレプトアビジン融合タンパク質を構築するための候補となる可能性がある。最初のp53結合タンパク質として同定されたSV40ラージT抗原が、高親和性相互作用を基にしたp53検出のための最初の融合タンパク質の作出のために選択された。この相互作用は、広い表面積上でのp53とSV40ラージT抗原の間の複数の接触により生じる。SV40 LT抗原は、残基123-215及び232-285を含むp53の2つの個別の領域に結合し、p53の中心DNA結合領域全体を包含している(Jenkins J. R., Chumakov P., Addison D., Sturzbecher H. W., 及びWade-Evans A., 「マウスp53のアミノ酸一次配列の2つの個別の領域は、シアミンウイルス40 T抗原との安定した複合体形成に関与する」, Journal of Virology, 62:3903-3906 (1988); Tan T. H., Wallis J., 及びLevine A. J., 「シアミンウイルス40ラージT抗原-p53タンパク質複合体の形成に関連するp53タンパク質ドメインの同定」, Journal of Virology, 59:74-583 (1986))。このSV40 LT抗原-ベースのp53検出アッセイの戦略は、図6に概略的に示している。

【0064】ストレプトアビジン及びSV40 Tagの融合タンパク質は、DNA断片のクローニング、T抗原の残基84-708に相当するポリペプチドの(Li B. 及びFields S., 「酵母-ツウハイブリッドシステムを使用するSV40ラージT抗原との結合に影響するp53突然変異の同定」, FASEB Journal, 7:957-963 (1993))、ストレプトアビジンの発現がバクテリオファージT7プロモーターの制御下にあるベクターである、pTSA-18Fプラスミド(Sano T. 及びCantor C. R., 「様々な特異的抗体複合体の工程作出を可能にするストレプトアビジン-プロテインAキメラ」, Bio/Technology, 9:1378-1381 (1991))へのコード化により構築することができる。得られたベクターは、2つの部分の間に10個の追加のアミノ酸残基を伴う、T抗原、それに続くストレプトアビジンのC-末端の融合タンパク質をコードしている。このストレプトアビジン融合タンパク質は、2-イムノビオチンアガロースによるアフィニティクロマトグラフィーにより精製される。この融合タンパク質の二重特異性は、p53のビオチン化されたプロテインA-セファロースCL-4Bビーズによる免疫沈降

により決定される。³⁵S-メチオニン標識したp53は、Wuらが示したように、in vitro翻訳し(Wu Y.、Liu Y.、Lee L.、Miner Z.、及びKulesz-Martin M.、「野生型又はスプライシングされたp53：in vitro及び細胞におけるDNAへの結合及び主要p53タンパク質との相互作用」、EMBO Journal、13:4823-4830 (1994))、かつ精製したT抗原-ストレプトアビジン融合タンパク質と共に、引き続きビオチン化されたプロテインA-セファロースCL-4Bビーズとインキュベーションすることができる。

【0065】検出反応は、総p53タンパク質を捕獲するためにp53特異的抗体で被覆されたマイクロタイタープレートにおいて行うことができる。捕獲されたp53タンパク質は、SV40 Tag及びストレプトアビジンの融合タンパク質により認識することができ、これはビオチン化されたDNA鋳型の捕獲を可能にする。捕獲されたDNA断片を溶解し、かつPCR増幅した。アガロースゲル電気泳動及び臭化エチジウム染色又はELOSA、もしくは光学的PCRを用いて、増幅されたDNAを測定することができる。増幅されたDNAの定量は、DNAアフィニティPCRによるp53 DNA結合の結果と組合せて、p53タンパク質の機能的結合指標を計算するために、例えば分母として使用することができる。

【0066】あるいは、p53タンパク質及び活性p53タンパク質の定量は、図6Aに示したような単独反応において行うことができる。活性及び総p53タンパク質は、p53特異的DNA鋳型及びビオチン化された非特異的DNA鋳型の存在下で、SV40 T抗原-ストレプトアビジン融合タンパク質により、異なるように認識することができる。SV40T抗原のp53 DNA結合への阻害作用を避けるために、特異的DNA鋳型は、最初にp53タンパク質と反応し、その後ビオチン化された非特異的DNAがSV40 T抗原-ストレプトアビジン融合タンパク質と共に添加しなければならない。捕獲されたDNA断片は溶解し、かつ対応するプライマーを用いるPCRにより増幅する。この特異的及び非特異的DNAから増幅されたDNA断片は、アガロースゲル電気泳動、それに続く臭化エチジウム染色においてサイズ別に区別することができる。あるいは、この増幅されたDNA断片は、ビオチンにより標識された1個のプライマーを用いるELOSA及びフルオレセインもしくはジゴキシゲニンを用いる別法により検出され、その結果特異的及び非特異的DNAは、フルオレセインについてはホースラディッシュペルオキシダーゼ複合体により及びジゴキシゲニンについてはアルカリホスファターゼ複合体により識別して検出することができる。より好ましくは、これらはCy5(発光675nm)又はCy3(発光567nm)で標識されたプライマーを用いる同時PCRにより検出することができる。増幅されたDNAの定量は、p53の機能的指標の算出のための分母として使用されるであろう。p53の機能的指標は、特異的DNAのシグナル強度を、非特異的DNAのシグナル強度で割ることにより算出される。p53の機能的指標＝[特

異的DNAのシグナル強度(活性p53タンパク質)]÷[非特異的DNAのシグナル強度(総p53タンパク質)]。

【0067】実施例2：エストロゲン受容体(ER)の定量
本発明のER定量のための微量-アッセイは、ERのエストロゲン結合特性を利用する。エストラジオールは、ERのカルボキシドメインに結合するERリガンドである。ビオチン化されたエストラジオールは、4個のビオチン分子と結合することが可能な四量体分子であるので、これは、ビオチン化されたDNA鋳型及びストレプトアビジンと複合する(図5C)。細胞溶解液中のエストロゲン受容体は、ER特異的抗体で被覆された固相マトリックス上に固定される。このアッセイにおいて、ERアミノ-末端ドメインを認識するモノクローナル抗-ER抗体は、ERのカルボキシー末端ドメインにおいてエストラジオール結合に対し立体障害を生じることではないので、これが使用される。捕獲されたERは、ビオチン化されたDNA鋳型が四量体アビジンの存在下で捕獲されるようなビオチン化されたエストラジオールと相互作用する。この結合したDNAは、PCRにより増幅され、かつアガロースゲル電気泳動及び臭化エチジウム染色もしくはELOSA、又は光学的PCRにより検出される。天然のリガンドを介したERの定量も、ERのリガンド結合特性を反映する利点を有する。リガンド結合の欠損は、乳癌におけるER異常のかなりの部分を示している。アッセイの特異性は、抗体及びエストロゲンリガンドの両者により定義されるので、これはELISAよりもより特異的である。エストロゲン結合の欠損は、乳癌におけるER不活化のメカニズムのひとつであるので、本アッセイへのエストラジオールの組入れは、ER検出の機能的局面を付け加える。

【0068】一次抗体は、マイクロタイタープレート上の非特異的部位をブロックするための5%脱脂した中等度粉末(nonfat mild powder)-ブロッキング剤(ウシ血清アルブミン(BSA)を使用する代わり、その理由はアルブミンは血液循環においてKd値が 10^{-6} Mのエストロゲン担体であるから)により、マイクロタイタープレート中で被覆することができる。この反応は、被験組織又は細胞の溶解液、並びにビオチン化されたエストラジオール、ニュートロアビジン及びビオチン化されたDNA鋳型の複合体を含有する溶液で行うことができる(Tiefenauer L. X. 及びAndres R. Y.、「酵素イムノアッセイにおけるビオチン-エストラジオール誘導体：最適な抗体結合のための構造要件」、Journal of Steroid Biochemistry、35:633-639 (1990))。ニュートロアビジンを使用する利点は、これがアビジン又はストレプトアビジンよりも中性に近い等電点を有することである。このことは、非特異的結合に寄与し得る静電相互作用を最小化する。

【0069】捕獲されたERは、四量体アビジンの存在下でビオチン化されたDNA鋳型を捕獲することができる。ビオチン化されたエストラジオールと相互作用することが

できる。この結合したDNAはPCRにより増幅することができ、かつアガロースゲル電気泳動及び臭化エチジウム染色もしくはELOSA、又は光学的PCRにより検出される。その天然のリガンドを介したERの定量も、ERのリガンド結合特性を反映している利点を有する。リガンド結合の欠損は、乳癌におけるER異常のかなりの部分を示している。アッセイの特異性は、抗体及びエストロゲンリガンドにより定義されるので、これはELISAよりもより特異的である。エストロゲン結合の欠損は、乳癌におけるER不活化のメカニズムのひとつであるので、本アッセイへのエストラジオールの組入れは、ERの検出の機能的局面を付け加える。

【0070】あるいは、活性及び総ERタンパク質は、単独反応中ストレプトアビジン及びビオチン化された非特異的DNA鋳型の存在下で、ER特異的DNA鋳型及びビオチン化されたエストラジオールにより区別して認識され得る(図6B)。捕獲されたDNA断片は溶離され、かつ対応するプライマーを用いてPCR増幅される。この特異的及び非特異的DNAから増幅されたDNA断片は、アガロースゲル電気泳動それに続く臭化エチジウム染色によりサイズ別に区別することができる。あるいは、この増幅されたDNA断片は、ビオチンで標識された1個のプライマーを用いるELOSA、及びフルオレセイン又はジゴキシゲニンによる別法により検出され、その結果特異的及び非特異的DNAが、フルオレセインについてはホスラディッシュペルオキシダーゼ複合体により及びジゴキシゲニンについてはアルカリホスファターゼ複合体により識別して検出することができる。より好ましくは、これらはCy5(発光675nm)又はCy3(発光567nm)で標識されたプライマーを用いる同時PCRにより検出することができる。増幅されたDNAの定量は、ERタンパク質の機能的指標の算出のための分母として使用されるであろう。ERの機能的指標は、特異的DNAのシグナル強度を、非特異的DNAのシグナル強度で割ることにより算出される。ERの機能的指標=[特異的DNAのシグナル強度(活性ERタンパク質)]÷[非特異的DNAのシグナル強度(総ERタンパク質)]。増幅したDNAの定量は、DNAアフィニティPCRによるERDNA結合の結果と組合せてERの機能的指標の計算のための分母として使用することができる。

【0071】具体的に図6は、DNAアフィニティアッセイの定量の概略を示している。図6Aは、DNAアフィニティPCRによるp53 DNA 結合の定量を例示している。溶解液中の総p53タンパク質は、固相マトリックス上に固定されたp53抗体により捕獲されるであろう。1サイズの特異的DNAは活性p53タンパク質に結合し、その後様々なサイズのビオチン化された非特異的DNAが、SV40 Tag-ストレプトアビジン融合タンパク質の存在下で、総p53タンパク質に結合するように添加されるであろう。捕獲された特異的及び非特異的DNAは、それらの対応するプライマーにより増幅されるであろう。図6Bは、DNAアフィニテ

ィPCRによるER DNA結合の定量を示している。溶解液中の総ERタンパク質は、固相マトリックス上に固定されたER抗体により捕獲されるであろう。この特異的DNAは、活性ERタンパク質にのみ結合する一方で、ビオチン化された非特異的DNAは、ビオチン化されたエストラジオール及びストレプトアビジンの存在下で、総ERタンパク質に結合する。捕獲された特異的及び非特異的DNAは、それらの対応するプライマーにより増幅されるであろう。増幅されたDNA産物は、例えば、1)アガロースゲル電気泳動(異なるサイズ)；2) ビオチンで標識された1個のプライマーを用いる酵素結合オリゴヌクレオチド吸着アッセイ(ELOSA)、及びフルオレセイン又はジゴキシゲニンを用いる別法(異なる酵素複合体)；又は、3) 蛍光分光サーマルサイクラーによる、Cy5又はCy3で標識したオリゴヌクレオチドによるPCR(異なる発光波長)により、検出及び定量される。特異的DNA結合及び非特異的DNAトラッピングのPCRシグナルの量は、機能的指標の比として示される。

【0072】変更したイムノPCRによるp53及びERの定量は、それらの機能的指標の計算のための量的値を提供する。しかし、143、175、248、及び273位のホットスポットを含むp53のTag結合領域内の特定のp53突然変異は、このTag-ベースのイムノPCRでは検出できない。これらの変異体のほとんどはDNA結合が不可能であるので、機能的指標は、p53突然変異の代わりにp53ヌル(nul1)として示されるであろう。一方で、p53ヌル及びp53突然変異は臨床的には同じであるとみなされるので、各シナリオに由来するこれらの結果は同等であり、かつ生物学的に意義がある。他方、このTag-ベースのp53検出アッセイによる、野生型p53タンパク質及び273変異体から陽性DNA結合を識別することは利点である。コドン273内の突然変異は、最も一般的なp53突然変異のひとつであり、総p53突然変異の13%を占めている。273位に突然変異を伴うp53タンパク質は、トランス活性化及び活性DNA結合を媒介することが可能である。273変異体は、DNA結合について陽性であるが、結合Tagについて陰性であるものと定義される。SV40 T抗原は、コンホメーションに依存した方法で、全DNA結合ドメインほとんど全てに渡ってp53に結合するので、SV40 T抗原及びストレプトアビジンの融合タンパク質(本発明において説明されている)は、p53コンホメーションの分析に関して、数個のアミノ酸で構成されたエピトープのみであるコンホメーションに依存したモノクローナル抗体を用いる凍結腫瘍組織切片のELISA又は免疫染色法よりもより良い手段を提供する。p53/SV40 T抗原単独のアッセイは、p53のための単純かつ感度の良い機能アッセイが開発される可能性を有する。エストラジオールベースのER検出の場合、リガンド結合に重要な C-末端ドメインの変更を伴う特定のERタンパク質は、検出されないであろう。このアッセイの特性は、リガンド結合の欠損を伴う一部のER変種

はDNA結合が可能であるので、ER機能の分析において大きい利点である。このエストラジオールベースのイムノPCRは、ER DNA結合の機能的指標の分母であることに加え、ER機能の評価の補完物として利用される。

【0073】本発明の目的は、治療様式を決定し、かつ個々の癌患者、例えば乳癌患者の分子欠損を基にした治療時に臨床経過をモニタリングする際に、医師及び患者に信頼のできる予後診断マーカーを提供することである。信頼できる予後診断マーカー及び特定の療法に対する患者の反応の信頼できる予測値は、個々の患者について最適治療をより合理的に選択しかつ不必要な毒性を避けるための情報を提供するであろう。野生型p53は、細胞周期のチェックポイントを媒介し、損傷を受けたDNAの修復又は修復不可能なDNA損傷を伴う細胞におけるアポトーシス誘導を可能にする。p53が媒介したアポトーシスは、様々な化学療法薬の作用の共通のメカニズムである。乳癌転帰が最悪の患者群は、例えばIHC陽性p53及び陽性Her2/neu受容体を有する患者を含み、これは乳癌患者においてp53の状態が重要であることを示している。しかしp53試験は、例えばIHCによるものであっても、現時点ではこれらの患者について実践には適用されず、かつ効果的治療法の選択における信頼できる予後診断マーカーとしてのp53突然変異は依然議論的である。機能アッセイは、タンパク質の予測値を確立する点でより強力でなければならない。p53タンパク質のDNA結合活性及びそのp53突然変異との相関に加え、下流遺伝子のトランス活性化が、EMSAにより集中的に研究されている。しかしこれらの研究は、概して、細胞培養試料、技術条件、及び臨床組織標本の分析に直接適用することが難しい方法に関連している。対照的に、本発明は、臨床場面において試験することを可能にしている。

【0074】本DNA結合アッセイをp53配列一特異的DNA結合の測定に拡大するために、DAIを臨床標本から調製された組織溶解液について使用することができる(図8)。p53の有意なDNA結合活性を、機能的指標が1.3~0.26の範囲である乳癌患者から得た臨床標本において検出した。p53突然変異に関する従来する方法と比較するために、これらの腫瘍標本を、DAIにおいて用いた抗体と同じD0-1を用いるIHCで分析した。IHC染色パターンは、腫

瘍間で異種性であった。一部は核染色を示したが、その他は細胞質の散在性の染色を示した。陽性p53染色は、標本20件中の10件において認められた(50%)。DAIの結果とIHCの結果の間のp53状態の一致は、標本のわずかに60%であった(表1)。有意なDNA結合は、IHC陽性p53を伴う2症例において認められた。他の5症例において、IHCは、イムノブロッティング及びDAIでは検出された非機能的p53タンパク質を検出することに失敗した。DAI及びIHCの間の不一致は、1)全てではないIHCで検出可能なp53は、p53突然変異を示すこと、及び2)全てではない不活性p53タンパク質は、IHC検出可能であることを示唆している。エストロゲン受容体の場合、IHCにより検出されたERタンパク質の全てではないが一部が、DNAに結合することが可能である。有意なDNA結合は、ER陽性腫瘍標本のほぼ1/4において検出不能であり、これは驚くべきことに、ホルモン療法に反応しないER陽性患者の割合に匹敵していた。

【0075】図8は、前述のことをより詳細に例示している。具体的には、図8は、DAIによるヒト乳癌におけるp53及びERのDNA結合活性を示している。総組織溶解液は、湿重量100~200mgの凍結ヒト乳癌標本から調製した。各標本からの組織溶解液のアリコート200 μ gに、p53及びERプローブのビオチン化されたDNAカクテルを使用するDAI(+)を施した。対応する組織溶解液40 μ gを、相対総タンパク質としてDAI試料の隣に負荷した(-)。これらの試料は、10%SDS-ゲルで分画し、かつER及びp53の抗体でブロッティングした。DAI(+)のシグナルを総タンパク質(-)で割って、機能的指標を算出した。対応する乳癌標本のパラフィン包埋切片を、p53タンパク質のD0-1ポリクローナル抗体で染色した。*ER及びプロゲステロン(PR)のIHCの結果は、RPCI Translational Research Tissue Supportプログラムにより得た。本発明は、DNA結合機能を測定することができ、かつ患者腫瘍のサブセットを更に特徴付けるために使用することができることを示している。個々の患者は、それらのDNA結合プロフィールに従い、治療様式を辿ることができる。

【0076】

【表1】表1：乳癌患者のp53及びER状態に関するDAIのIHCとの比較

番号	日	診断	エストロゲン受容体		p53	
			IHC/PR*	機能的指標	IHC	機能的指標
B1	7/29/97	侵襲性乳管 Ca	-/+	0.01	+	0.01
B2	9/30/97	発生部位内乳管 Ca	+/-	0.00	+	0.44
B3	8/5/97	侵襲性乳腺葉 Ca	+/+	0.64	N/A	0.48
B4	5/7/99	弱拡散性腺癌	-/-	0.01	-	0.15
B5	2/3/98	侵襲性乳管 Ca	+/+	1.12	+	1.18
B6	5/29/98	発生部位内乳腺葉 Ca	+/+	0.80	-	1.36
B7	9/8/98	侵襲性乳管 CA	+/-	0.51	+	0.09
B8	10/9/98	弱散在性乳管 Ca	+/+	0.62	-	0.18
B9	11/27/98	発生部位内乳管 Ca	-/-	0.05	-	0.02
B10	6/30/98	侵襲性乳管 Ca	+/+	0.00	-	0.03
B11	2/1/94	侵襲性乳管 Ca	+/+	0.37	-	0.07
B12	2/23/94	侵襲性乳管 Ca	-/-	0.00	-	0.26
B13	9/13/94	侵襲性乳管 CA	+/+	0.12	+	0.01
B14	6/7/94	侵襲性乳管 CA	-/-	0.07	+	0.02
B15	7/5/94	侵襲性乳管 CA	N/A	0.01	+	0.02
B16	1/12/94	侵襲性乳管 Ca	N/A	0.10	+	0.03
B17	1/12/94	発生部位内乳管 CA	+/+	0.02	+	0.03
B18	3/30/94	侵襲性乳管 CA	+/+	0.69	+	0.07
B19	4/6/94	侵襲性乳管 CA	+/+	0.91	-	0.29
B20	5/25/94	侵襲性乳管 CA	-/-	0.00	-	0.00
B21	9/6/94	侵襲性乳管 CA	N/A	0.23	-	0.05
陽性%			66%	40%	50%	30%
IHC との%相関				77%		60%

【図面の簡単な説明】

【図 1】 図 1 は、並行イムノブロッティングによる、総p53タンパク質及び結合したp53タンパク質の定量法を示す流れ図である。

【図 2】 図 2 は、DNA 結合において活性のあるp53タンパク質の定量の感度、配列特異的DNA結合の競合、および異なるp53遺伝子型を持つ細胞における機能的p53タンパク質の測定を示す比較チャートである。

【図 3】 図 3 は、イムノブロッティングを使用する、マウスの乳房モデルにおけるp53及びERタンパク質の機能分析を示している。

【図 4】 図 4 は、DNAアフィニティイムノブロッティングによる、ミスマッチDNA構造へのp53結合の同定を示

している。

【図 5】 図 5 は、個別に行った活性結合タンパク質及び総タンパク質に関するPCRを用いるDNAアフィニティアッセイの該略図である。

【図 6】 図 6 は、結合及び未結合p53及びERタンパク質の並行トラッピング及びPCR増幅用のPCRを用いる、DNAアフィニティアッセイの概略図である。

【図 7】 図 7 は、臭化エチジウム染色法により視覚化した結合したPCR増幅したDNAのマイクロタイタープレートを示している。

【図 8】 図 8 は、DAIによるヒト乳癌におけるp53及びERタンパク質のDNA結合活性を示している。

【図1】

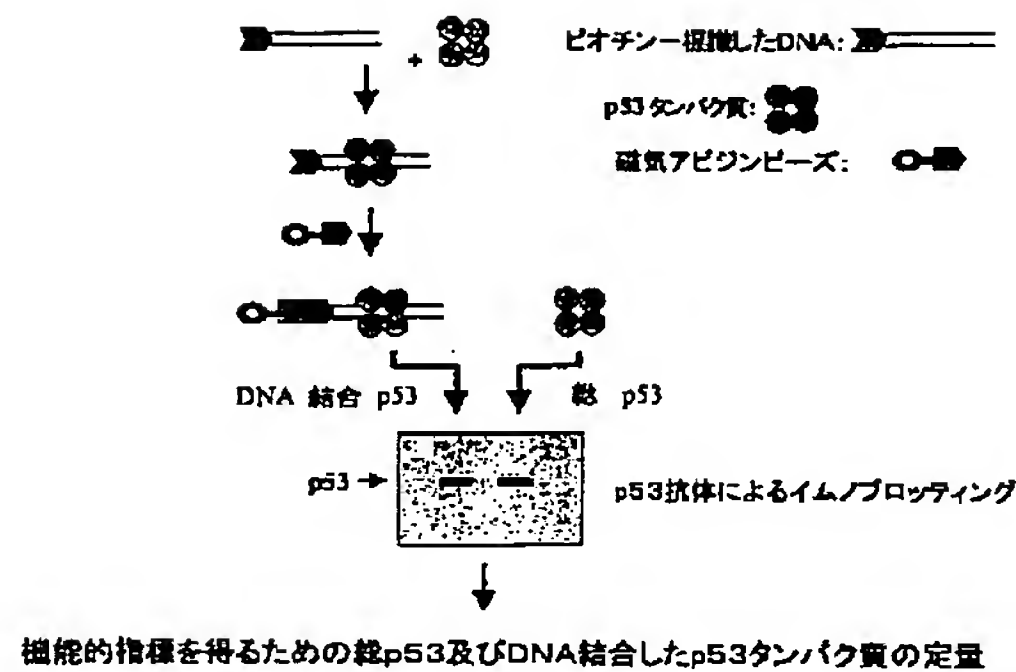


図1

【図3】

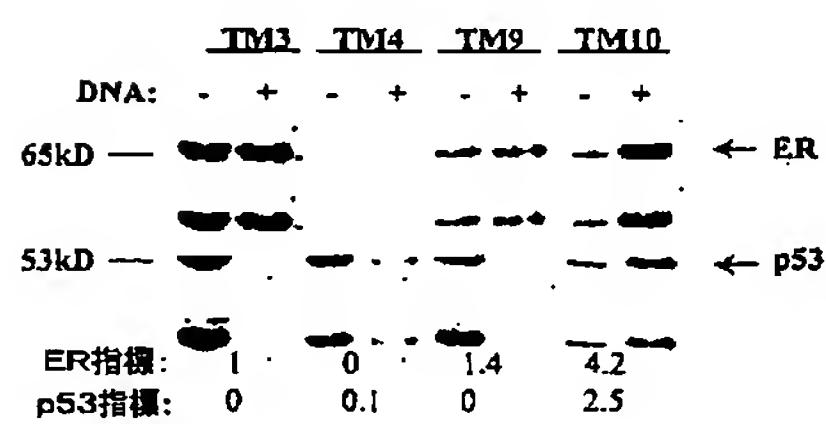


図3

【図2】

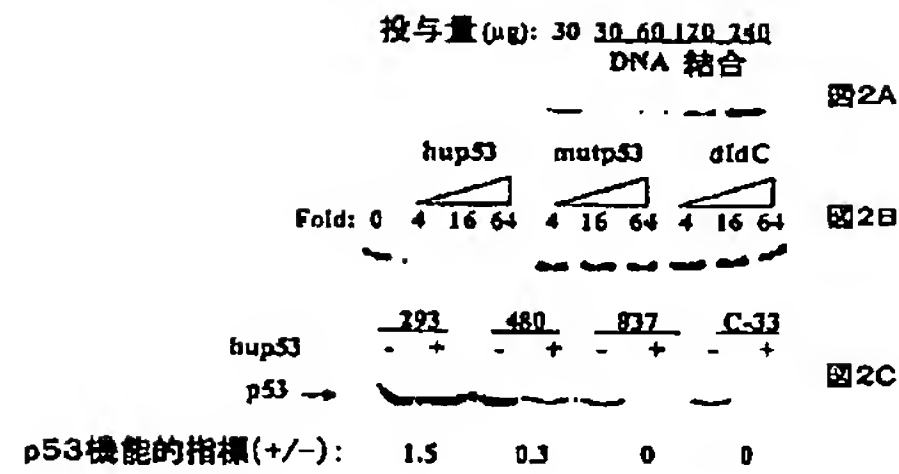


図2

【図4】

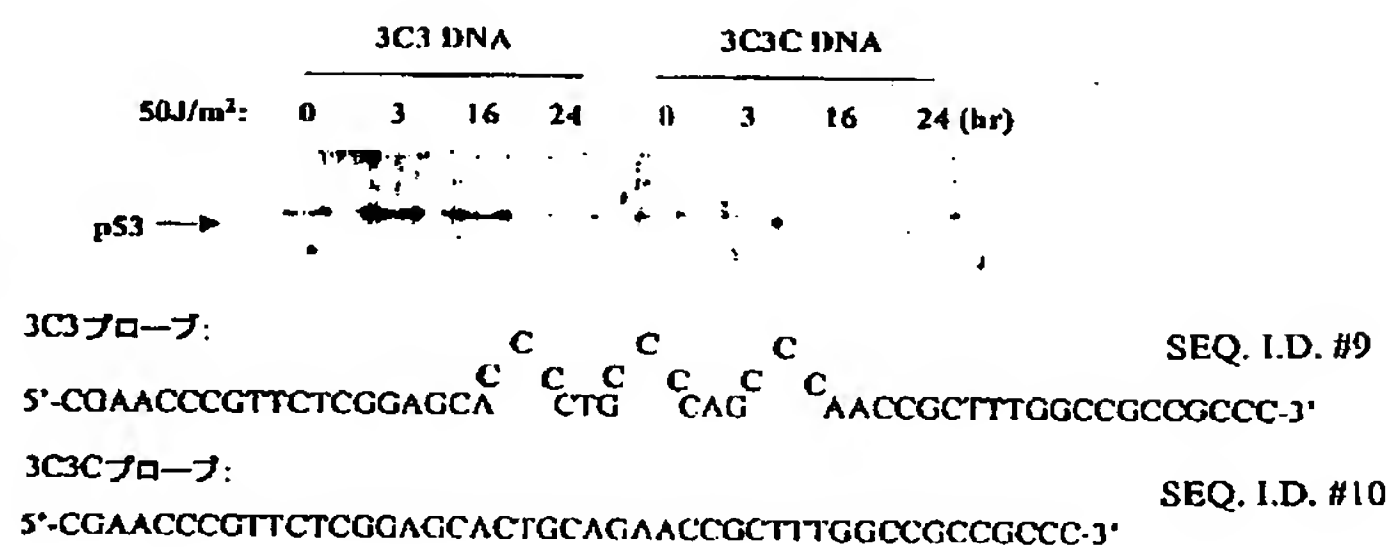


図4

【図5】

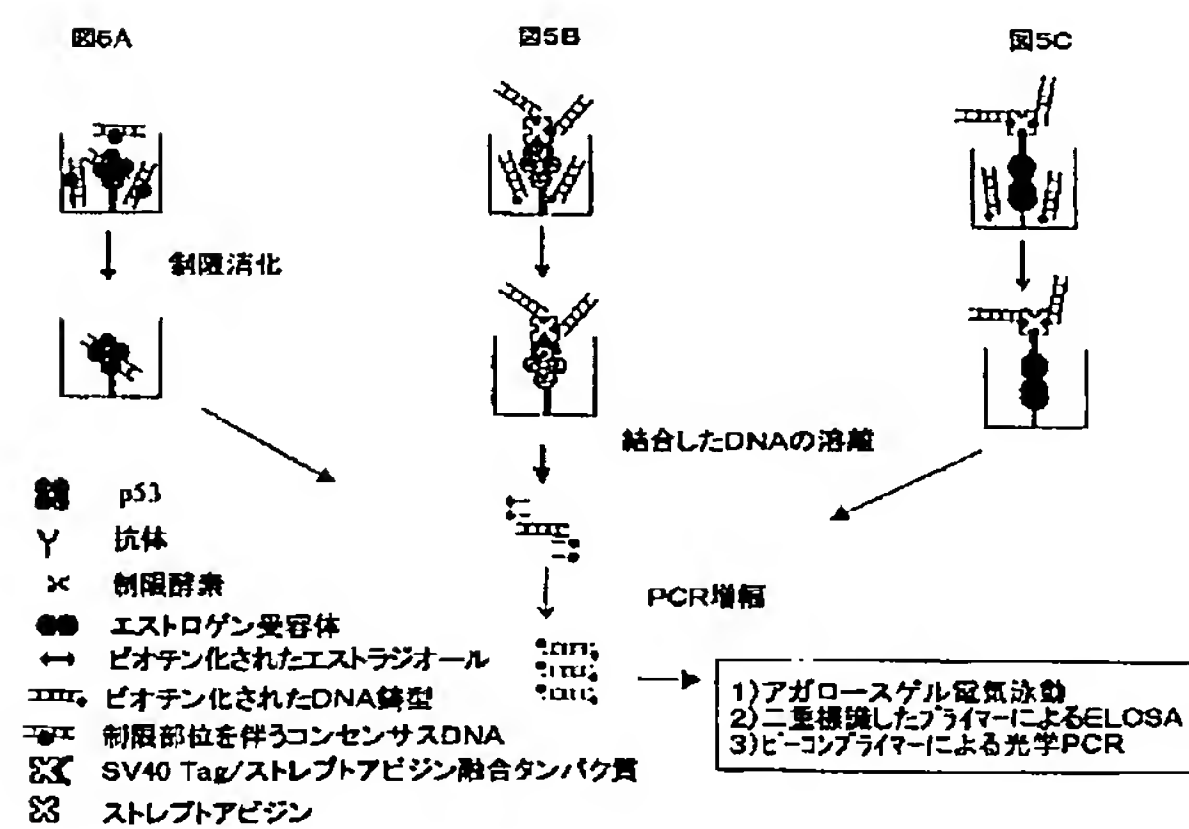


図5

【図6】

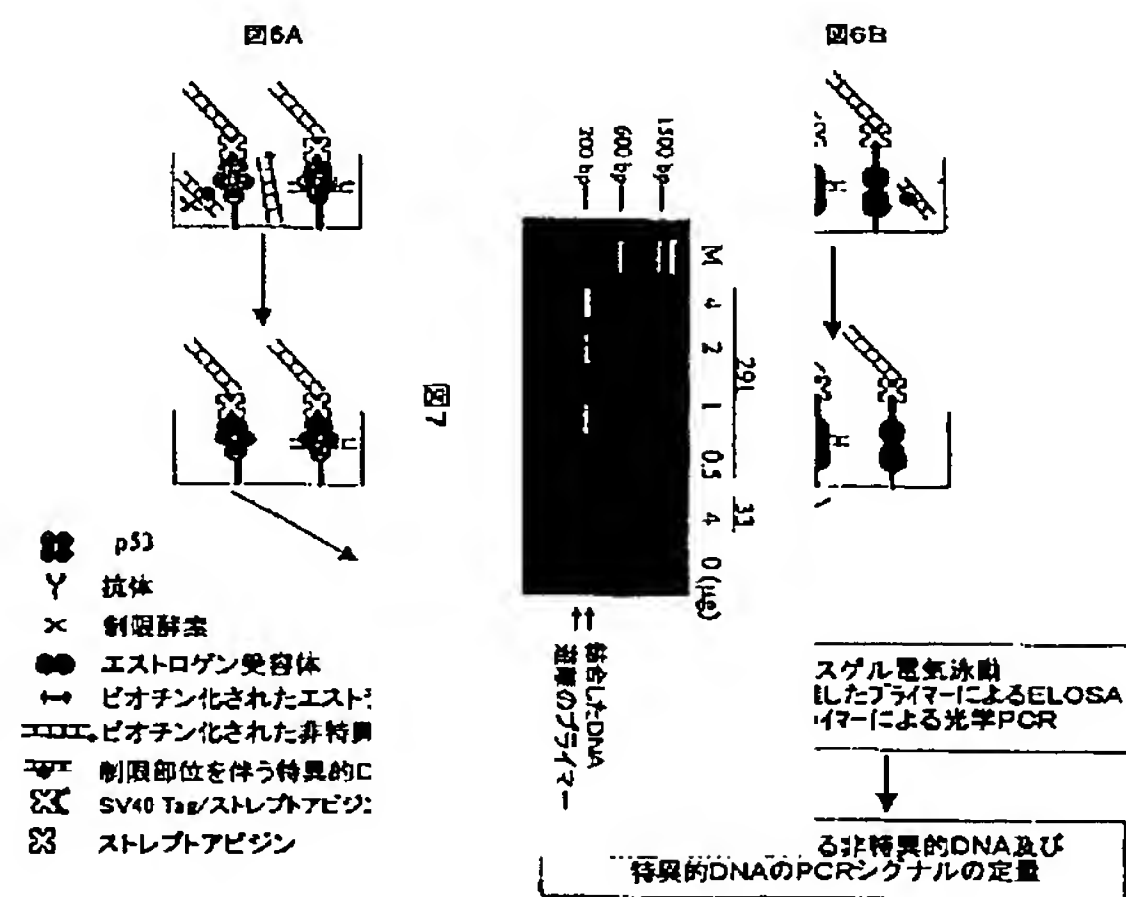


図6

【図 7】

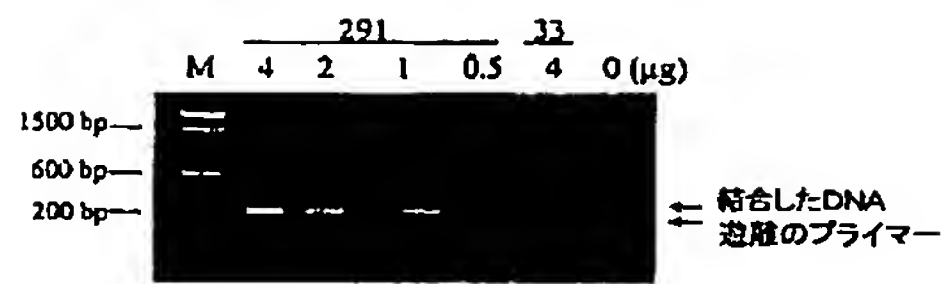


図 7

【図 8】

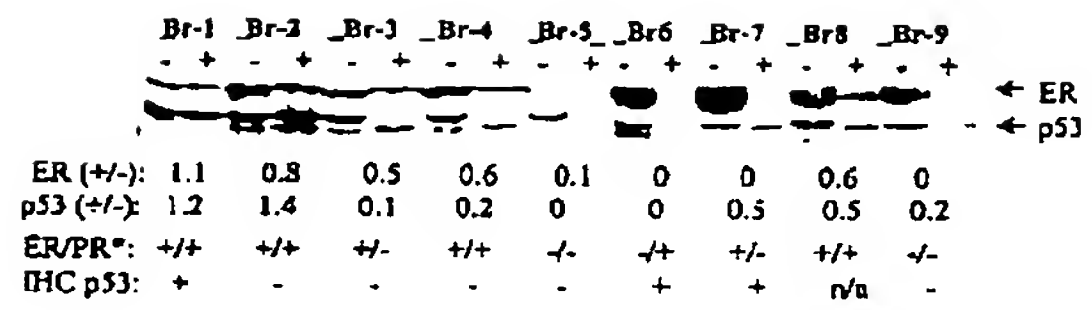


図8

【手続補正書】

【提出日】平成13年7月18日（2001. 7. 18）

【手続補正 1】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 3

【補正方法】変更

【補正内容】

【図 3】

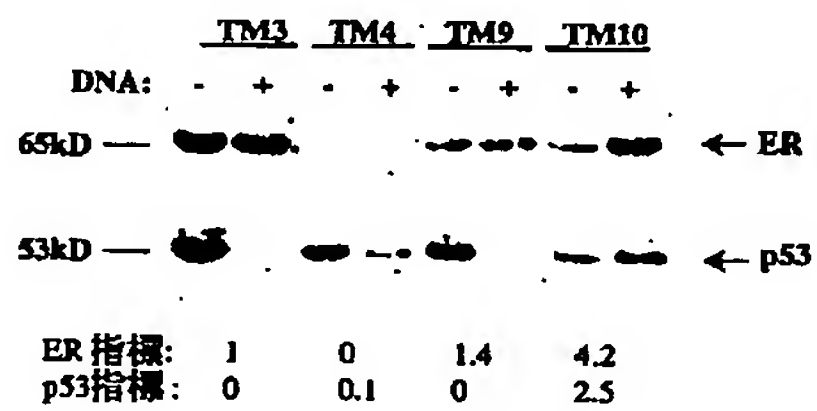


図3

【手続補正 2】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 6

【補正方法】変更

【補正内容】

【図 6】

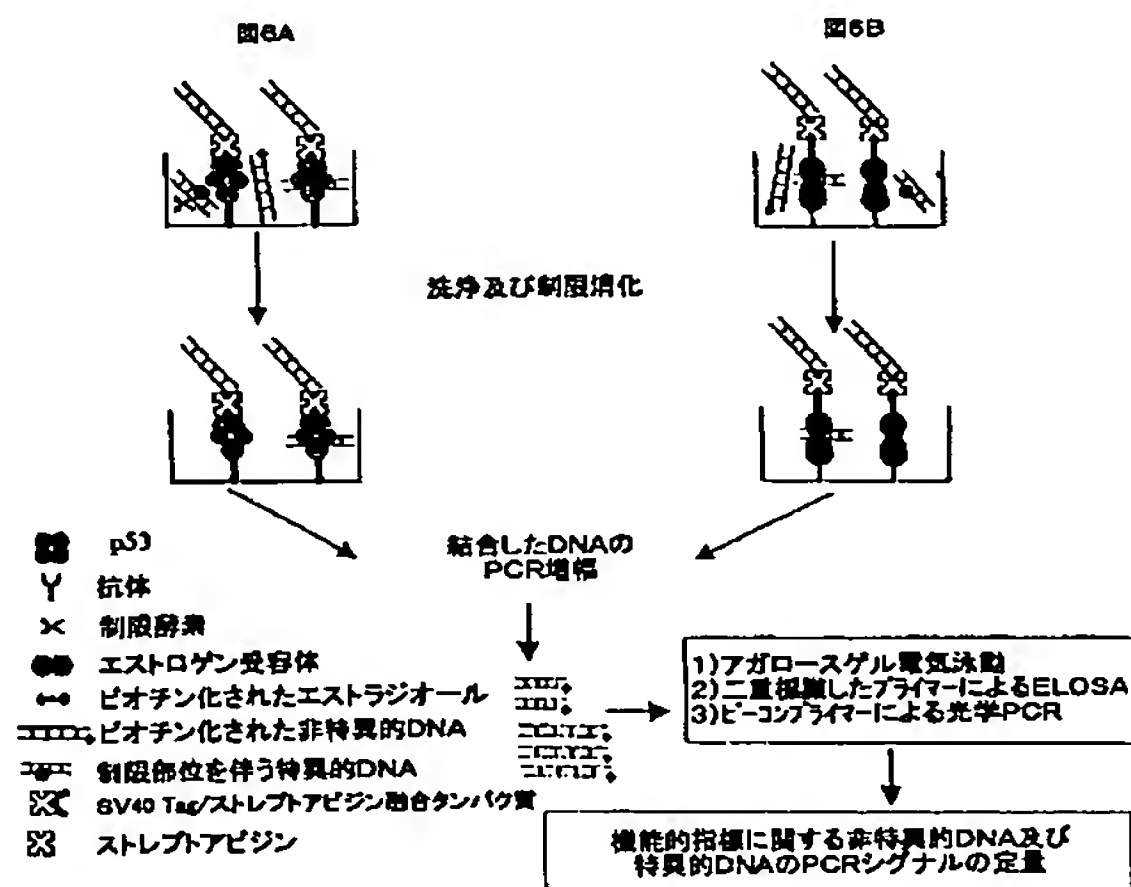


図6

フロントページの続き

(51)Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	ターマコード (参考)
G O 1 N	33/53	G O 1 N	33/566
	33/566	C 1 2 M	1/00 A
// C 1 2 M	1/00		1/20
	1/20		1/34 F
	1/34	C 1 2 N	15/00 Z N A A

(72)発明者 モリー エフ クルツ マーティン
アメリカ合衆国 オレゴン州 97229 ポ
ートランド ティンバー リッジ コート
8443

(72)発明者 ユアンガン リウ
アメリカ合衆国 オレゴン州 97229 ポ
ートランド サウスウエスト ヴァーモン
ト ストリート 2252